

Aus der Pferdeklinik der Vetsuisse-Fakultät
Universität Zürich

(Direktor: Prof. Dr. med. vet. J. A. Auer, MS, Dipl. ACVS, ECVS)

Arbeit unter der Leitung von PD Dr. med. vet. B. von Rechenberg, Dipl. ECVS

**Chemische und physikalische Nachweismethoden
Superparamagnetischer Nanopartikel
zur Beurteilung deren Wirkung auf Zellen des
Bewegungsapparates
In vitro Studie an Osteoblasten, Chondrozyten und
Synovialzellen von Schafen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Vetsuisse-Fakultät

Universität Zürich

vorgelegt von

Bernhardt Schöpf

Tierarzt

von Freising, Bundesrepublik Deutschland

Genehmigt auf Antrag von

PD Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin

Prof. Dr. med. vet. Andreas Pospischil, Korreferent

Zürich 2004

für

Mama und Papa,

sowie

Claudi

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	13
1.1	Grundlagen	13
1.2	Einsatzgebiete von SPN.....	14
1.2.1	Klinische Diagnostik.....	14
1.2.2	Klinische Therapie	15
1.2.3	Genforschung	15
1.2.4	Technik.....	15
1.3	Ziel der Arbeit.....	16
2	Literatur	17
2.1	Superparamagnetische Nanopartikel (SPN).....	17
2.2	Partikelarten und Partikelaufbau	17
2.3	Nachweismethoden von SPN.....	19
2.3.1	Berliner-Blau-Färbung.....	19
2.3.2	Turnbulls-Färbung	20
2.3.3	Konfokalmikroskopie	20
2.3.4	Elektronenmikroskopie	21
2.3.5	Fluoreszenzmikroskopie	22
2.3.6	Fourier Transform Infrared Analyse.....	23
2.3.7	„X-Ray Diffraction“ (XRD).....	23
2.3.8	SQUID-Magnetometer.....	24
2.3.9	„Mapping Local Susceptibility“	24
2.3.10	Magnet Resonanz Tomographie (MRT).....	25
2.3.11	Szintigraphie	26
2.4	Synthese und „Coating“ von SPN.....	27
2.4.1	„Coating“ nach chemischer Präzipitation von SPN.....	27
2.4.2	„Coating“ während chemischer Präzipitation ³²	29
2.4.3	Synthese mittels Mikroemulsion ⁶⁶	29
3	Material und Methoden.....	31
3.1	Monolayer-Zellkulturen.....	31
3.1.1	Verwendete Zellen.....	31
3.1.2	Verwendete Chemikalien und Geräte:	31
3.1.3	Synovialzellen (SZ)	33

3.1.3.1	Spezielles Material	33
3.1.3.2	Auftauen.....	33
3.1.3.3	Vorkultivierung in Zellkulturflaschen	34
3.1.3.4	Hauptkultivierung in 6-Loch-Platten / auf 3-Kammer-Objektträgern.....	34
3.1.3.5	Einfrieren	35
3.1.4	Chondrozyten (CZ)	36
3.1.4.1	Spezielles Material	36
3.1.4.2	Auftauen.....	36
3.1.4.3	Vorkultivierung in Zellkulturflaschen	36
3.1.4.4	Hauptkultivierung in 6-Loch-Platten / auf 3-Kammer-Objektträgern.....	36
3.1.4.5	Einfrieren	36
3.1.5	Osteoblasten (OB)	37
3.1.5.1	Spezielles Material:	37
3.1.5.2	Auftauen.....	37
3.1.5.3	Vorkultivierung in Zellkulturflaschen	38
3.1.5.4	Hauptkultivierung in 6-Loch-Platten / auf 3-Kammer-Objektträgern.....	38
3.1.5.5	Einfrieren	38
3.2	Partikelzugabe, Inkubation mit Magneten und Fixierung der Zellen	39
3.2.1	Getestete SPN.....	39
3.2.2	Vorversuche.....	40
3.2.2.1	Vorversuch I.....	40
3.2.2.2	Vorversuch II:	40
3.3	Histochemie und Immunhistochemie	41
3.3.1	Verwendete Chemikalien und Geräte	41
3.3.2	Vorversuche.....	42
3.3.2.1	Vorversuch III	42
3.3.2.2	Vorversuch IV	42
3.3.3	Histochemie.....	42
3.3.3.1	Berliner-Blau-Reaktion.....	42
3.3.3.2	Turnbulls-Reaktion.....	43
3.3.3.3	Quinckes-Reaktion	43
3.3.4	Immunhistochemie.....	43
3.3.4.1	Direkte Immunhistochemie.....	44
3.3.4.2	Indirekte Immunhistochemie	44
3.4	Hauptversuch.....	45
3.4.1	Monolayer-Zellkulturen	45
3.4.2	Verwendete Superparamagnetische Nanopartikel.....	46
3.4.3	Histochemie.....	46
3.4.4	Immunhistochemie.....	47
3.4.5	Physikalische Methoden.....	47

3.4.5.1	Verwendete Chemikalien und Geräte	47
3.4.5.2	Transmissions Elektronen Mikroskopie	48
3.4.5.3	Mapping Local Susceptibility	49
3.5	Auswertung der verschiedenen Methoden.....	49
3.5.1	Berliner-Blau-Reaktion	50
3.5.2	Turnbulls-Blau-Reaktion.....	50
3.5.3	Immunfluoreszenz	50
3.5.4	TEM	51
3.5.5	Mapping Local Susceptibility.....	51
4	Resultate.....	53
4.1	Monolayer-Zellkulturen.....	53
4.1.1	Synovialzellen	53
4.1.2	Chondrozyten	54
4.1.3	Osteoblasten	54
4.2	Histochemie-Vorversuche	55
4.2.1	Fixierung der Zellen.....	55
4.2.2	Berliner-Blau-Reaktion	56
4.2.3	Turnbulls-Reaktion	56
4.2.4	Quinckes-Reaktion.....	56
4.3	Immunhistochemie-Vorversuche.....	57
4.3.1	Direkte Immunhistochemie	57
4.3.2	Indirekte Immunhistochemie.....	57
4.4	Histochemie-Hauptversuch.....	58
4.4.1	Berliner-Blau-Färbung.....	58
4.4.1.1	Methode	58
4.4.1.2	Zellreaktionen.....	59
4.4.1.3	Partikeleigenschaften.....	59
4.4.1.4	Konzentrationen	60
4.4.1.5	Inkubationszeiten.....	60
4.4.2	Turnbulls-Reaktion	65
4.4.2.1	Methode	65
4.4.2.2	Zellreaktionen.....	65
4.4.2.3	Partikeleigenschaften.....	65
4.4.2.4	Konzentrationen	65
4.4.2.5	Inkubationszeiten.....	65
4.4.3	Quinckes-Reaktion.....	70
4.5	Immunhistochemie	70
4.5.1	Direkte Immunhistochemie	70

4.5.2	Indirekte Immunhistochemie.....	70
4.5.2.1	Methode	70
4.5.2.2	Zellreaktionen.....	70
4.5.2.3	Partikeleigenschaften.....	71
4.5.2.4	Konzentrationen	71
4.5.2.5	Inkubationszeiten.....	71
4.6	Physikalische Methoden.....	73
4.6.1	TEM	73
4.6.1.1	Methode	73
4.6.1.2	Zellreaktionen.....	73
4.6.1.3	Partikeleigenschaften.....	73
4.6.1.4	Konzentrationen	74
4.6.1.5	Inkubationszeiten.....	74
4.6.2	Mapping Local Susceptibility.....	76
4.6.2.1	Methode	76
4.6.2.2	Zellreaktionen.....	76
4.6.2.3	Partikeleigenschaften.....	76
4.6.2.4	Konzentrationen	77
4.6.2.5	Inkubationszeiten.....	77
5	Diskussion.....	79
5.1	Vorversuche	79
5.1.1	Zellkulturen	79
5.1.2	Histochemie.....	81
5.1.3	Immunhistochemie.....	81
5.2	Hauptversuch.....	83
5.2.1	Histochemie.....	83
5.2.2	Immunhistochemie.....	85
5.2.3	TEM	86
5.2.4	„Mapping Local Susceptibility“	87
5.3	Zusammenfassung	89
5.4	Zukunftsperspektiven	90
6	Anhang.....	91
7	Literaturverzeichnis.....	97
8	Danksagung.....	109
	Lebenslauf.....	111

Abkürzungsverzeichnis

AK	=	Antikörper
ALP	=	alkalische Phosphatase
Aqua _{dest}	=	destilliertes Wasser
BGJ _b	=	Biggers-, Gwartkin-, Jackson-, Basset- Medium
CZ	=	Chondrozyten
DMEM	=	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	=	Dimethylsulfoxid
EM	=	Elektronen Mikroskop
EPFL	=	Ecole Polytechnique Federale de Lausanne
Epon [®]	=	Epoxy embedding medium
FBS	=	Fötales Bovines Serum
FITC	=	Fluorescein Isothiocyanate
FT-IR	=	Fourier Transform Infrared
GBSS	=	Gey's Balanced Salt Solution
HCl	=	Salzsäure
3-K-OT	=	3-Kammer-Objektträger
KTH	=	Kungl Tekniska Högskolan
MFM	=	Magnetic Force Microscopy
MRT	=	Magnet Resonanz Tomographie
NaCl	=	Natrium Chlorid
NaOH	=	Natronlauge
OB	=	Osteoblasten
P	=	Partikel
PBS	=	Phosphat-buffered-saline
PE	=	Phycoerythrin
P / S	=	Penicillin / Streptomycin
SEM	=	Scanning Elektronen Mikroskopie- Untersuchungen
SPN	=	Superparamagnetische Nanopartikel
SQUID	=	Superconducting Quantum Interference Device
SZ	=	Synovialzellen
TEM	=	Transmission Elektronen Mikroskopie
XRD	=	X-Ray Diffraction

Abbildungsverzeichnis

<u>Abb 1.1:</u> Bildliche Darstellung der Ersten (a), Zweiten (b) und Dritten Generation (c) von Superparamagnetischen Nanopartikeln.....	14
<u>Abb 2.1:</u> Schematische Darstellung vier verschiedener Arten von magnetischen Nanopartikeln (A-D) nach Do-Kyung Kim (2001).....	18
<u>Abb 3.1 (a) und 3.1 (b):</u> Zellkultivierung in Petrischalen auf 3-Kammer-Objekträgern ohne (a) und mit (b) Magnet.....	35
<u>Abb 4.1:</u> Auswertung der Berliner-Blau-Färbung von Partikel 2 in Hinblick auf den Anteil toter Zellen.....	61
<u>Abb 4.2:</u> Auswertung der Berliner-Blau-Färbung von Partikel 3 in Hinblick auf den Anteil toter Zellen.....	61
<u>Abb 4.3:</u> Auswertung der Berliner-Blau-Färbung von Partikel 15 in Hinblick auf den Anteil toter Zellen.....	61
<u>Abb 4.4:</u> Auswertung der Berliner-Blau-Färbung von Partikel 2 in Hinblick auf die Veränderung der Zellform.....	62
<u>Abb 4.5:</u> Auswertung der Berliner-Blau-Färbung von Partikel 3 in Hinblick auf die Veränderung der Zellform.....	62
<u>Abb 4.6:</u> Auswertung der Berliner-Blau-Färbung von Partikel 15 in Hinblick auf die Veränderung der Zellform.....	62
<u>Abb 4.7:</u> Auswertung der Berliner-Blau-Färbung von Partikel 2 in Hinblick auf intrazelluläre Aufnahme.....	63
<u>Abb 4.8:</u> Auswertung der Berliner-Blau-Färbung von Partikel 3 in Hinblick auf intrazelluläre Aufnahme.....	63
<u>Abb 4.9:</u> Auswertung der Berliner-Blau-Färbung von Partikel 15 in Hinblick auf intrazelluläre Aufnahme.....	63
<u>Abb 4.10:</u> Berliner-Blau-Färbung von SZ mit Partikel 3 nach 2 Stunden Inkubation.....	64
<u>Abb 4.11:</u> Berliner-Blau-Färbung von SZ mit Partikel 3 nach 48 Stunden Inkubation.....	64
<u>Abb 4.12:</u> Berliner-Blau-Färbung von CZ mit Partikel 2 nach 2 Stunden Inkubation.....	64
<u>Abb 4.13:</u> Berliner-Blau-Färbung von CZ mit Partikel 2 nach 48 Stunden Inkubation.....	64
<u>Abb 4.14:</u> Berliner-Blau-Färbung von OB mit Partikel 3 nach 2 Stunden Inkubation.....	64

<u>Abb 4.15:</u> Berliner-Blau-Färbung von OB mit Partikel 3 nach 48 Stunden Inkubation.....	64
<u>Abb 4.16:</u> Auswertung der Turnbulls-Färbung von Partikel 2 in Hinblick auf den Anteil toter Zellen.....	66
<u>Abb 4.17:</u> Auswertung der Turnbulls-Färbung von Partikel 3 in Hinblick auf den Anteil toter Zellen.....	66
<u>Abb 4.18:</u> Auswertung der Turnbulls-Färbung von Partikel 15 in Hinblick auf den Anteil toter Zellen.....	66
<u>Abb 4.19:</u> Auswertung der Turnbulls-Färbung von Partikel 2 in Hinblick auf die Veränderung der Zellform.....	67
<u>Abb 4.20:</u> Auswertung der Turnbulls-Färbung von Partikel 3 in Hinblick auf die Veränderung der Zellform.....	67
<u>Abb 4.21:</u> Auswertung der Turnbulls-Färbung von Partikel 15 in Hinblick auf die Veränderung der Zellform.....	67
<u>Abb 4.22:</u> Auswertung der Turnbulls-Färbung von Partikel 2 in Hinblick auf intrazelluläre Aufnahme.....	68
<u>Abb 4.23:</u> Auswertung der Turnbulls-Färbung von Partikel 3 in Hinblick auf intrazelluläre Aufnahme.....	68
<u>Abb 4.24:</u> Auswertung der Turnbulls-Färbung von Partikel 15 in Hinblick auf intrazelluläre Aufnahme.....	68
<u>Abb 4.25:</u> Turnbulls-Färbung von SZ mit Partikel 3 nach 2 Stunden Inkubation.....	69
<u>Abb 4.26:</u> Turnbulls-Färbung von SZ mit Partikel 3 nach 48 Stunden Inkubation.....	69
<u>Abb 4.27:</u> Turnbulls-Färbung von CZ mit Partikel 2 nach 2 Stunden Inkubation.....	69
<u>Abb 4.28:</u> Turnbulls-Färbung von CZ mit Partikel 2 nach 48 Stunden Inkubation.....	69
<u>Abb 4.29:</u> Turnbulls-Färbung von OB mit Partikel 3 nach 2 Stunden Inkubation.....	69
<u>Abb 4.30:</u> Turnbulls-Färbung von OB mit Partikel 3 nach 48 Stunden Inkubation.....	69
<u>Abb 4.31:</u> Fluoreszenzmikroskopie von SZ mit Partikel 3 nach 2 Stunden Inkubation.....	72
<u>Abb 4.32:</u> Fluoreszenzmikroskopie von SZ mit Partikel 3 nach 48 Stunden Inkubation.....	72
<u>Abb 4.33:</u> Fluoreszenzmikroskopie von CZ mit Partikel 2 nach 2 Stunden Inkubation.....	72
<u>Abb 4.34:</u> Fluoreszenzmikroskopie von CZ mit Partikel 2 nach 48 Stunden Inkubation.....	72
<u>Abb 4.35:</u> Fluoreszenzmikroskopie von OB mit Partikel 3 nach 2 Stunden Inkubation.....	72

<u>Abb 4.36:</u> Fluoreszenzmikroskopie von OB mit Partikel 3 nach 48 Stunden Inkubation.....	72
<u>Abb 4.37:</u> TEM von SZ mit Partikel 3 nach 2 Stunden Inkubation.....	75
<u>Abb 4.38:</u> TEM von SZ mit Partikel 3 nach 48 Stunden Inkubation.....	75
<u>Abb 4.39:</u> TEM von CZ mit Partikel 2 nach 2 Stunden Inkubation.....	75
<u>Abb 4.40:</u> TEM von CZ mit Partikel 2 nach 48 Stunden Inkubation.....	75
<u>Abb 4.41:</u> TEM von OB mit Partikel 3 nach 2 Stunden Inkubation.....	75
<u>Abb 4.42:</u> TEM von OB mit Partikel 3 nach 48 Stunden Inkubation.....	75
<u>Abb 4.43:</u> Mapping local susceptibility von SZ mit Partikel 3 nach 2 Stunden Inkubation....	78
<u>Abb 4.44:</u> Mapping local susceptibility von SZ mit Partikel 3 nach 48 Stunden Inkubation..	78
<u>Abb 4.45:</u> Mapping local susceptibility von CZ mit Partikel 3 nach 2 Stunden Inkubation ...	78
<u>Abb 4.46:</u> Mapping local susceptibility von CZ mit Partikel 3 nach 48 Stunden Inkubation .	78
<u>Abb 4.47:</u> Mapping local susceptibility von OB mit Partikel 3 nach 2 Stunden Inkubation ...	78
<u>Abb 4.48:</u> Mapping local susceptibility von OB mit Partikel 3 nach 48 Stunden Inkubation .	78

Zusammenfassung

Einleitung und Ziel: In dieser *in vitro* Arbeit wurden Superparamagnetische Nanopartikel (SPN) anhand verschiedener histologischer, histochemischer und physikalischer Methoden für das menschliche Auge sichtbar gemacht. Ausserdem wurde mit diesen Methoden die Reaktion der verschiedenen Dextran- und Polyvenylalkohol- und mit anderen Substanzen stabilisierten Partikeln in Hinsicht auf Biokompatibilität, d.h. Zellaufnahme / -abgabe und Toxizität auf Zellen des Bewegungsapparates (Synovialzellen (SZ), Chondrozyten (CZ), Osteoblasten (OB)) beobachtet. Somit konnte bei einer enormen Vielzahl an verschiedenen, auf dem Markt erhältlichen, Nanopartikeln eine Vorauswahl für später folgende *in vivo* Versuche getroffen werden.

Material und Methoden: Der erste Schritt bestand darin, die beste Art und Weise der Zellkultivierung zu entwickeln, um die Nachweise einfach, effektiv und schnell durchzuführen. Im zweiten Schritt wurde anhand der vorausgegangenen Ergebnisse versucht, SPN an Zellkulturen, im Hinblick auf den späteren *in vivo* Einsatz nachzuweisen. Dafür wurden die Methoden: histochemische Färbungen (Berliner-Blau, Turnbulls), Immunhistologie (direkte- und indirekte Immunfluoreszenz), Elektronenmikroskopie (TEM) und „Mapping Local Susceptibility“ angewendet. Diese Methoden wurden an einer Vielzahl von SPN, die sich in Hersteller, Produktionsweise, Zusammensetzung, Grösse und „Coating“ unterschieden, durchgeführt. Im dritten Schritt wurden drei ausgewählte SPN in verschiedenen Konzentrationen (2.5, 1.25 und 0.625mg/ml) und unterschiedlichen Zeiten (3, 12, 24 und 48 Stunden) auf jeweils SZ, CZ und OB inkubiert und anschliessend mittels der oben erwähnten Nachweismethoden beurteilt. Dazu wurden die Gesichtspunkte: Anteil toter Zellen, Sichtbarkeit einzelner Partikel, Ausgespartheit des Zellkernes, Partikel im Zytoplasma und Zellform nach einem semiquantitativen „score“-System mit den Punkten 0 – 3 beurteilt um schliesslich eine rein deskriptive Auswertung durchführen zu können.

Ergebnisse: Die optimale Methode im Rahmen der Nachweiserbringung war die Zellkultivierung auf 3-Kammer-Objektträgern. Als die geeignetsten Partikel setzten sich drei Avidin ummantelte Partikel [(10nm; Liquid Research), (130nm; Micromod) und (250nm; Micromod)] durch und schliesslich wurden die Berliner-Blau-Reaktion, die Turnbulls-Färbung und die TEM als die aussagekräftigsten und zuverlässigsten der Nachweismethoden identifiziert.

Diese Ergebnisse bilden eine Grundlage auf die in später folgenden *in vivo* Versuchen aufgebaut werden kann.

Summary

Introduction and goal of the study: Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPN) coated with dextran, polyvinyl alcohol (PVA) and other substances were shown to be biocompatible and non-toxic in cells of the musculoskeletal system in previous experiments. The goal of this study was to compare different histological methods for the most reliable detection of SPN in synovial cells (SZ), chondrocytes (CZ) and osteoblasts (OB) after incubation *in vitro*. This was seen as preliminary tests for later *in vivo* studies, where the biocompatibility, toxicity and mainly the characteristics of their elimination behaviour were to be tested in experimental animals.

Materials and methods: Different iron oxide particles with dextran-, biotin-, avidin-, streptavidin-, gold- and PVA-coatings were used for incubation on cell cultures. SZ, CZ and OB were incubated on six-well-plates and three chamber slides in different concentrations (2.5, 1.25, 0.625 mg/ml) and for different time periods (3, 12, 24, 48 hours). Thereafter, histochemical stainings, such as Pearls Blue and Turnbulls reaction, direct and indirect immunofluorescence using dextran coated SPN functionalised with avidine or biotin, electron microscopy (TEM) and “Mapping Local Susceptibility” were applied for particle detection within the cells. A semi-quantitative score system following a descriptive evaluation was used to assess the fraction of dead cells, single particle structure, omission of the nucleus, intraplasmatic particles and cell morphology.

Results: In preliminary experiments, the three SPN: dextran-avidin (10nm; Liquid Research), dextran-avidin (130nm; Micromod) and dextran-avidin (250nm; Micromod) could be reliably detected in cell cultures, and thus, were further used for the main experiments. The D-avidine coated, 250nm particles (particle 3) proved to be the most suitable for detection within the cells. As for the cultivation technique the method where cells were incubated on top of three chamber slides proved to be the most reliable, fastest and most effective. Pearls blue-, the Turnbulls staining and the TEM were the most reliable methods for the chosen SPN detection in cells.

Discussion and conclusion: SPN can reliably be detected in cells of the musculoskeletal system *in vitro* using special iron stainings for Fe²⁺, Fe³⁺, direct or indirect immunohistochemical methods using antibodies against avidine-coated particles and TEM.

1 Einleitung

1.1 Grundlagen

Diese Studie ist im Rahmen eines EU-Projektes mit dem Titel: „Magnetic nanoparticles for medical and biological diagnostics and devices“ (Magnanomed[□]), angefertigt worden.

Sie stellt die Folgestudie der Dissertationsarbeit von Tobias Neuberger mit dem Titel: „Wirkung von superparamagnetischen Nanopartikeln auf Zellen des Bewegungsapparates; *In vitro* Studie an Osteoblasten, Chondrozyten und Synovialzellen“, (2002; Universität Zürich) dar⁹².

Das EU-Projekt zielte darauf ab, neuartige und verbesserte Superparamagnetische Nanopartikel (SPN) mittels verschiedener chemischer und physikalischer Methoden herzustellen, mit denen der biomedizinische Einsatz erweitert werden kann. Die Verbesserung soll auf einer optimalen Partikelsynthese beruhen, bei der die Partikelgrößen und -formen definiert und die Oberflächen mit spezifischen, chemischen Gruppen und Stoffen besetzt und funktionalisiert werden. Ausserdem sollen die superparamagnetischen Eigenschaften verbessert und die Zell- und Gewebeverträglichkeit erhöht werden. Es wird angestrebt, dass für die verschiedenen Einsatzfelder ganz gezielt spezifische SPN hergestellt werden.

Die vorausgegangene *in vitro* Arbeit beschäftigte sich allgemein mit der Bioverträglichkeit und mit spezifischen Toxizitätsdosen verschiedener SPN auf Synovialzellen (SZ), Chondrozyten (CZ) und Osteoblasten (OB). Es wurden lichtmikroskopische Beurteilungen der verschiedenen Zellen durchgeführt, ohne die SPN und deren intrazelluläre Verteilung an sich zu betrachten. Deshalb wurde das Mass der Reaktion der Zellen anhand von mRNA-Induktionen von Zytokinen und proinflammatorischen Mediatoren bestimmt.

Das Gebiet der Nanopartikeltechnologie wurde in der Forschung schon in den 80er Jahren angegangen, wobei der Einsatz in der Medizin vor allem in den letzten 15 Jahren sehr grosse Fortschritte gemacht hat. Diese Entwicklungsgeschichte der SPN bis zum heutigen Stand, kann in drei Schritten zusammengefasst werden, was zur Veranschaulichung in Abbildung 1.1 dargestellt ist.

Bei der ersten Generation von Nanopartikeln handelte es sich um einheitlich aufgebaute, d.h. monomere Verbindungen (z.B. Eisenoxid). Diese Partikel lagen bereits als kolloidale, d.h. fein verteilte Lösung vor. Durch Zugabe von oberflächenaktiven Substanzen entstanden dabei mehrere hundert Nanometer grosse Aggregate.

Aus dieser ersten Generation entwickelte sich die Zweite, bei der die einzelnen Partikel bereits eine polymere Grundsubstanz aufweisen und somit aus einem Kern und einer Hülle bestehen. Durch diese Hülle, die aus verschiedenen Molekülen (z.B. Dextran) bestehen kann, ist eine Stabilisierung der Partikel in einer Lösung möglich, womit die Partikel einzeln mit einem Durchmesser von 10 bis 100 nm isoliert bleiben.

Bei der mittlerweile existierenden dritten Generation wurden die vorher gewonnenen Erkenntnisse übernommen und eine Anlagerung von weiteren spezifischen Molekülen und Elementen, wie Biotin, Streptavidin, Avidin oder Gold an die Hülle der Partikel vorgenommen. Durch diese weitere Anlagerung, auch „Coating“ genannt, konnten für jedes Einsatzgebiet spezielle Partikel hergestellt werden. Dieser schrittweise Aufbau der Partikel wird nach dem „bottom-up“-Prinzip, d.h. vom Kern über die stabilisierende Hülle bis hin zum spezifischen „Coating“ durchgeführt. Dadurch entstanden schließlich bis zu 1 μ m grosse, einzelne Gebilde.

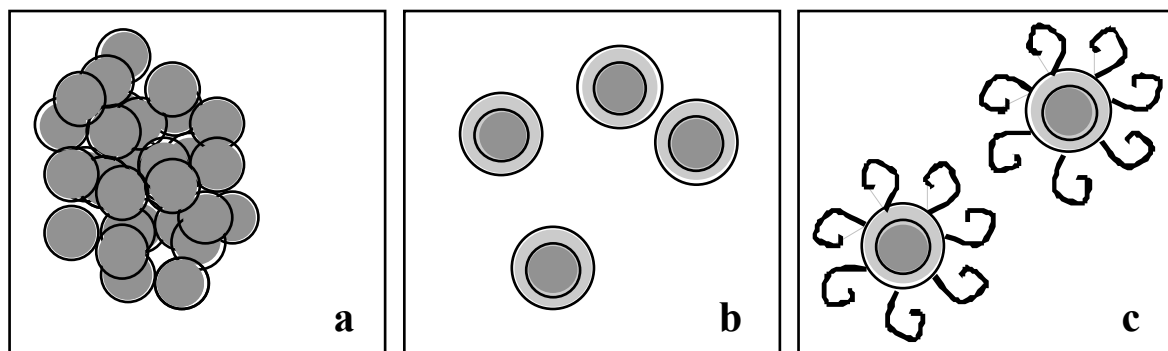


Abb. 1.1: Erste (a), zweite (b) und dritte (c) Generation von Superparamagnetischen Nanopartikeln

1.2 Einsatzgebiete von SPN

Die Haupteinsatzgebiete liegen in der klinischen Diagnostik, klinischen Therapie, Genforschung und der Technik:

1.2.1 Klinische Diagnostik

- Kontrastmittel für Magnet Resonanz Tomographie (MRT), um z.B. Herz- und Hirninfarkte, Tumore, oder Organschädigungen (z.B. an Leber) zu diagnostizieren und zu lokalisieren
- Kontrastmittel zur MR-Lymphographie

1.2.2 Klinische Therapie

- Tumorthherapie durch Hyperthermie
- Magnetische Separation:
 - Blutreinigung
 - Separierung, Erkennung und Entfernung von abgeschwemmten Tumorzellen
- „Drug-Targeting“: SPN als Trägerstoff für Arzneimittel zur gezielten Anreicherung in Geweben
- Gentherapie durch Gentransfer bei Herzerkrankungen
- Magnetfeldunterstützte Radionuklid Therapie

1.2.3 Genforschung

- DNA/RNA-Isolierung und Sequenzierung
- Gezielter und potenziertes Gentransfer bei der Gencharakterisierung
- Proteinanalyse
- Genexpression

1.2.4 Technik

- Trennung von Gemischen aus Buntmetallen und Elektronikschrott
- Anreicherung von Edelmetallen (z.B. Gold oder Diamanten) aus tauben Gesteinen im Bergbau
- Schmiermittel für wartungsarme Gleitlager
- Einsatz in Elektromotoren

Durch den Einsatz der neuartigen SPN vor allem in der Medizin und Forschung lassen sich folgende Vorteile erzielen:

- ➔ Verringerung der Arzneimitteldosis auf ein Minimum
- ➔ Verringerung der unerwünschten Nebenwirkungen von Arzneimitteln
- ➔ Schnellere Penetration des Arzneistoffes in das gewünschte Gewebe
- ➔ Gezielte Wirkung des Arzneimittels am gewünschten Ort

- ➔ Höhere Konzentrationen des Arzneimittels am Wirkungsort
- ➔ Verringerung der Behandlungskosten
- ➔ Verbesserung und Beschleunigung von PCR durch spezifische „Primer“-Markierung
- ➔ Gezielte Kontrolle der Genexpression
- ➔ Schnellere und empfindlichere Diagnostik bei der Erkennung und Behandlung von Krankheiten

Das Sichtbarmachen von Partikeln ist nicht nur in der medizinischen Forschung mit Superparamagnetischen Nanopartikeln, sondern auch bei der Herstellung und in der Anwendung notwendig, um z.B. deren Grösse, Struktur, Verteilung oder deren Charakter beobachten zu können.

In den Publikationen werden chemische und physikalische Methoden beschrieben. Bei den chemischen werden die Berliner-Blau-Färbung, die Turnbolls-Färbung und die Fluoreszenz eingesetzt. Als physikalische Methoden werden Lichtmikroskopie, Elektronenmikroskopie, Konfokalmikroskopie, FT-IR-Analyse, X-Ray-Diffraction, SQUID-Magnetometer, Mapping Local Susceptibility, Magnet Resonanz Tomographie und Szintigraphie angewandt.

1.3 Ziel der Arbeit

Die Erkenntnisse aus der vorangegangenen Dissertationsarbeit von Neuberger definierten den Ausgangspunkt und die Problemstellung dieser Dissertationsarbeit. Bei einer derartigen Methodenvielfalt um Nanopartikel nachzuweisen, zu charakterisieren und sichtbar zu machen, war es notwendig die dafür am besten geeignete, leicht durchführbare und vor allem zuverlässigste Methode herauszufinden. Vor allem im Hinblick auf zukünftig geplante *in vivo* Arbeiten am Bewegungsapparat von Schafen wurde dies als notwendig angesehen. Aus diesem Grund beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit den Nachweismethoden *in vitro* an Zellen des Bewegungsapparates (SZ, CZ und OB). Aus der Vielfalt an Nachweismöglichkeiten wurden diejenigen ermittelt, angewandt und letztendlich so verbessert und optimiert, dass sie für den zukünftigen *in vivo* Nachweis zur Beurteilung von Organen und Geweben einsetzbar sind. Dabei ist unter anderem auch die Fragestellung wichtig, ob einzelne Partikel oder nur eine grobe Lokalisation mehrerer Partikelanhäufungen erkennbar sind. Als zusätzliches Ziel der Arbeit wird mit den letztendlich ausgewählten Methoden die Wirkung der Partikel auf die drei oben genannten Zellarten mittels eines rein deskriptiven Verfahrens beurteilt.

2 Literatur

Die genutzte Literatur befasst sich fast ausschliesslich mit den physikalischen und chemischen Nachweismethoden der superparamagnetischen Nanopartikel. Die verschiedenen Einsatzgebiete der Partikel in der Medizin und die verschiedenen Partikelarten werden jeweils nur kurz angeschnitten, da diese Themen in der vorangegangenen Dissertation von Neuberger⁹² schon ausführlich behandelt worden sind.

2.1 Superparamagnetische Nanopartikel (SPN)

Die erste Voraussetzung für Teilchen mit superparamagnetischen Eigenschaften ist, dass sie aus ferromagnetischem Material bestehen. Dieses wird definiert als ein Material in dem Interaktionen zwischen benachbarten Atomen auftreten und sich dadurch die atomaren Dipolmomente ausrichten¹⁵. Dieser ferromagnetische Effekt wird bei Stoffen beobachtet, die unter anderem aus Eisen, Nickel oder Kobalt bestehen. Besitzen Partikel einen Durchmesser von mehr als 1 μm , bilden sich nach deren Einbringung in ein externes Magnetfeld sogenannte homogene magnetisch geladene Domänen aus, die auch bei der Entfernung des Magnetfeldes ihre magnetischen Eigenschaften nicht verlieren. Bei kleineren Partikeln mit einem Durchmesser von 100 bis 500nm, existiert nur eine derartige Domäne pro Partikel, die ihre magnetischen Eigenschaften bei der Entfernung aus einem externen Magnetfeld teilweise verliert. Bei sehr kleinen, ca. 10-50nm grossen, Partikeln sind die magnetischen Eigenschaften nicht stabil, d.h. sie weisen ohne Vorhandensein eines externen Magnetfeldes keinerlei magnetische Ladung mehr auf. Dieser Effekt wird als Superparamagnetismus bezeichnet^{19, 39}, und somit diese kleinsten Partikel als Superparamagnetische Nanopartikel.

2.2 Partikelarten und Partikel Aufbau

Die verschiedenen Typen von magnetischen Nanopartikeln lassen sich, wie bei Neuberger⁹² beschrieben, in vier Gruppen einteilen: 1.) Unmodifizierte SPN ohne „Coating“, 2.) SPN mit spezieller, chemischer Oberflächenmodifikation und 3.) SPN mit spezifischen Substanzen

oder Erkennungsgruppen. Zusätzlich findet in der Literatur die Einteilung in vier Gruppen (nach Do-Kyung; 2001) ²⁴ Erwähnung:

Typ-A stellt den Idealtyp von SPN dar, bei dem die einzelnen Partikel nach der Herstellung in einer Flüssigkeit getrennt, nebeneinander vorliegen und keine Interaktionen zwischen den einzelnen Partikeln auftreten. Die magnetischen Eigenschaften werden allein durch die Grösse der Partikel bestimmt. Als Untergruppe von Typ-A-Partikeln werden diejenigen angesehen, bei denen die Trennung der einzelnen Partikel durch langkettige Moleküle (z.B. Dextran) erfolgt.

Typ-B Partikel bestehen aus einem Kern mit einer Hülle. Dadurch werden einerseits Interaktionen zwischen den Partikeln und andererseits auftretende Reaktionen zwischen Kern und Hülle vermieden.

Typ-C: beschreibt Partikel, bei denen zwei chemisch unterschiedliche Materialien kombiniert sind. Die magnetischen Partikel liegen zwischen einer nicht magnetischen Matrix, so dass die magnetischen Eigenschaften vom Volumen der Partikel und von der Art der Matrix bestimmt werden.

Typ-D Partikel liegen in einer einzigen Phase vor, wobei die kristallinen und die nicht kristallinen Materialien chemisch gleich sind.

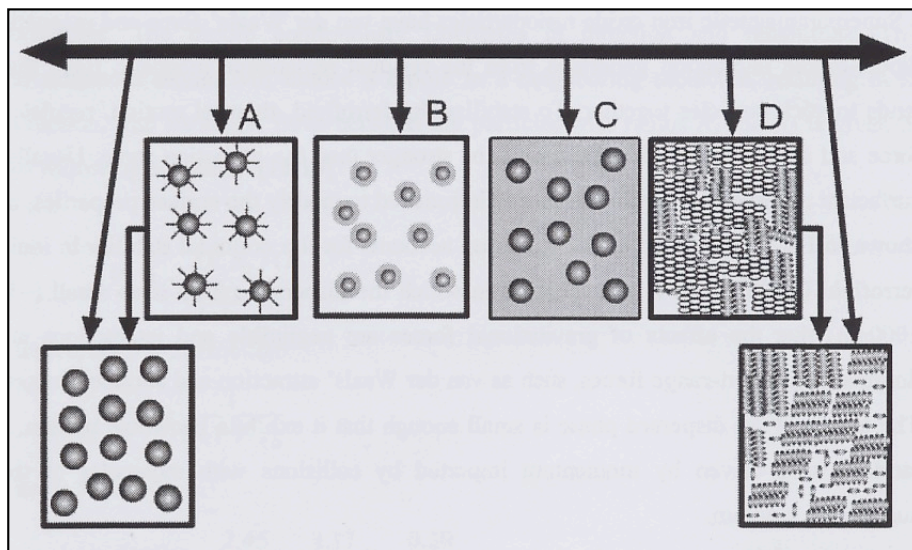


Abb. 2.1: Schematische Darstellung vier verschiedener Arten (A-D) von magnetischen Nanopartikeln nach Do-Kyung Kim (2001) ²⁴

2.3 Nachweismethoden von SPN

2.3.1 Berliner-Blau-Färbung

Die Berliner Blau Färbung wird als histochemische Färbemethode zum Nachweis von Fe^{3+} -Ionen routinemässig seit vielen Jahrzehnten in der Histopathologie angewandt^{38, 50, 67, 70, 75, 88, 93, 97, 134}.

Im Zusammenhang mit SPN wurde durch diese Färbung z.B. die Permeabilität des subkupalären Raumes für Endolymphe, der sich im Vestibularapparat befindet, bei Tauben beobachtet⁵². An Stelle von vorher angewandten farbigen Lösungen, wurden dabei erstmals Dextran-Eisenoxid-Nanopartikel verwendet, die durch Magnete gelenkt wurden. Die Permeabilität wurde in histologischen Schnitten beobachtet, die nach der Berliner-Blau-Methode gefärbt wurden. Zwei weitere Studien beschäftigten sich mit der Diagnostik von arteriosklerotisch veränderten Gebieten in der Gefässwand als Früherkennung vor einer Einengung des Gefässlumens^{117, 121}. Dabei wurde ein eisenoxidpartikelhaltiges Kontrastmittel eingesetzt dessen Aufnahme in das Gewebe histologisch mit der Berliner-Blau-Färbung beurteilt wurde. Eine andere Arbeit befasste sich mit dem Abstossungsprozess von transplantierten Nieren bei Ratten¹⁴². Dort wurden den Tieren SPN in Form von Eisenoxidpartikeln intravenös verabreicht, wobei das Hauptaugenmerk in diesem Fall auf der Anhäufung von Immunzellen (z.B. Makrophagen) in der Niere lag. Zur post mortem veranlassten, histologischen Untersuchung wurden histologische Schnitte der Nieren mit Berliner-Blau-Reagenz gefärbt. Beckmann⁵ markierte Nierenmakrophagen mit SPN, um frühzeitige Abstossungsreaktionen von transplantierten Nieren bei Mäusen zu diagnostizieren, nämlich bevor die Abstossung anhand der Funktionseinschränkung des Organs festgestellt wurde. Rausch forschte ebenfalls über Makrophagen und „dextran-coated“ Nanopartikel¹⁰⁸. Er zeigte, dass sich um ischämische Gehirnläsionen Makrophagen ansammeln, welche eine Aussage über das Vorhandensein und das Ausmass der Schäden geben können. Diese Makrophagen markierte er mit SPN und machte das enthaltene Eisen mittels Berliner-Blau-Färbung histologisch sichtbar. Bestätigt wurden die Ergebnisse mittels MRT.

Gellissen³⁵ wollte den Einfluss von SPN auf MRT beobachten und wählte dafür ein Abszess-Modell mit Ratten. Da die MRT eine dominante Rolle in der Diagnostik von weichen Strukturen des „muskuloskelettalen“ System darstellt, ist dieser Versuchsansatz von grosser

Bedeutung. Um die Ansammlung der SPN, in diesem Fall PEG-Fe₃O₄-Partikel, post mortem besser beurteilen zu können, wurden histologische Schnitte der Abszesse angefertigt und mit dem Berliner-Blau-Reagenz gefärbt.

2.3.2 Turnbulls-Färbung

Während die Berliner-Blau-Färbung, Fe³⁺-Ionen nachweist, wird die Turnbulls-Reaktion verwendet um Fe²⁺-Ionen in Geweben histologisch nachzuweisen¹²⁹. Beim Nachweis dieser zweiwertigen Eisenionen handelt es sich um nicht-haem Eisen. Die Turnbulls-Färbung wird im Vergleich zur Berliner-Blau-Reaktion eher selten eingesetzt. Jedoch konnte mit dieser Methode festgestellt werden, dass z.B. in Hepatozyten, Kupferzellen, Makrophagen der Milz und in Parietalzellen des Magens bei Ratten, grössere Anhäufungen von nicht-haem Eisen vorhanden sind⁸⁴.

In Verbindung mit Hämochromatose wird die Turnbulls-Färbung mehrmals erwähnt. Studien, die sich mit dem Thema befassen, können Eisenkonzentrationen in Organen, wie z.B. in der Leber histologisch nachweisen^{99, 100, 130}.

Um die Verteilung von Eisen im menschlichen Gehirn von Leichen festzustellen, wurde in einer Arbeit sowohl die Turnbulls-, als auch die Berliner-Blau-Färbung angewandt⁸⁹.

2.3.3 Konfokalmikroskopie

Um mittels Konfokalmikroskopie einen Nachweis zu erbringen und ein aussagekräftiges Bild zu erhalten, muss ein Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt werden¹⁴³. Dabei haftet sich Fluorescein Isothiocyanate (FITC) und Propidiumiodid (PI) an Synaptogamin, welches sich wiederum an die Plasmamembran von apoptotischen Zellen bindet. Ausserdem werden Eisenoxid-SPN an dieses Protein gebunden, um die Reaktion auch im MRT darzustellen. Die Konfokalmikroskopie wird ebenfalls angewendet²⁶, um die Bindung von FITC und Eisenoxid-SPN an T-Zellen zu beobachten. Damit kann die „normale“ T-Zell Antwort mit der T-Zell Antwort verglichen werden, bei der die T-Zellen mit einem „HIV-transaktivator-peptide“ beladen sind. Mittels MRT konnte die Verteilung dieser beladenen T-Zellen nach intravenöser Injektion in Mäuse beobachtet werden. Um SPN direkt im Konfokalmikroskop zu sehen, injizierte Kahn in Mäuselebern ein MRT-Kontrastmittel, das aus Texas Rot und

Europium markierten Eisenoxid-Nanopartikel bestand. Mittels der Fluoreszenzfarbstoffe konnte er die Akkumulation der Partikel des Kontrastmittels in der Leber damit nachweisen⁵⁹.

2.3.4 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie wird, in Form der Transmissions Elektronen Mikroskopie (TEM), bei der Forschung mit SPN sehr häufig angewandt. Da die meisten Partikel einen Durchmesser kleiner als 100nm besitzen, wird diese Methode gewählt, um die einzelnen Partikel sichtbar zu machen. Weissleder benutzte diese Methode schon 1990 um die Verteilung von SPN im Blut und deren Penetration durch die Kapillärwände zu zeigen¹³⁵. Mit lichtmikroskopischen Methoden (Berliner-Blau oder Turnbolls-Reaktion) lassen sich die Partikel zwar anfärben, allerdings ist keine Unterscheidung der einzelnen Partikel möglich. Ausserdem können sehr geringe Konzentrationen, z.B. die Aufnahme nur sehr weniger Partikel in eine Zelle (z.B. Hepatozyten) nur elektronenmikroskopisch genau betrachtet und beurteilt werden¹³¹. Deshalb bestätigte Daldrup die Ergebnisse seiner Arbeit, indem er histologischen Schnitte sowohl mit der Histopathologie mittels Eisenfärbung als auch mit dem Elektronenmikroskop betrachtete. Er zeigte damit, dass durch den Einsatz einer Strahlentherapie mit 3x4Gy die Blut-Knochenmark-Schranke zerstört wird²².

Ein Grossteil der Literatur beschäftigt sich mit SPN als Kontrastmittel. Darin wird jeweils die elektronenmikroskopische Methode als zusätzliche und exakteste Methode gewählt, um die einzelnen Partikel nach der Injektion des SPN-haltigen MRT-Kontrastmittels in Organen, wie Leber und/oder Milz^{28, 107, 111, 136}, Lymphknoten¹³, Lunge und Milz¹²⁷ und Zellen, wie Tumorzellen¹¹⁶ oder Makrophagen^{27, 117, 142}, nachzuweisen. Die transkapilläre Aufnahme von SPN-haltigen MRT-Kontrastmitteln beobachtete Siauve mittels EM¹²³.

Ein weiterer Einsatz der TEM besteht darin, die Nanopartikel jeweils vor dem *in vivo* und *in vitro* Einsatz, im Hinblick auf Durchmesser, Grössenverhältnisse in einer Probe und Akkumulationen, zu beurteilen^{30, 56, 57, 76}.

2.3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenz wird in Verbindung mit SPN eingesetzt, entweder um diese Partikel bei der Herstellung von unerwünschten Bestandteilen zu separieren, oder um die Partikel zu markieren und so deren Verlauf und Verhalten im tierischen oder menschlichen Körper zu beobachten (siehe Kapitel 2.3.3). Pinto-Alphanday¹⁰⁴ verwendete den Partikel FITC-Dextran 70, um die Nanopartikel zu markieren und sie von unerwünschten Stoffen zu trennen. Ebenfalls mit Dextran-FITC-Nanopartikel fand Sahoo heraus, dass die Bindung, bzw. die Freigabe von FITC von den Partikeln Temperatur- und pH-abhängig ist. Dieses Erkenntnis wurde anschließend in der Gentherapie eingesetzt¹¹⁹. Weitere Studien beschäftigten sich mit der Aufnahme von FITC-Nanopartikeln in bestimmten Organen, wie in der glatten Muskulatur von Gefäßen¹²⁶ oder Darmepithelien^{91, 118}. Die Studie von Russell-Jones diente als Grundlage, um Nanopartikel als Trägerstoff für Medikamente, die oral verabreicht und dermal resorbiert werden sollen, einzusetzen. Ein Jahr später veröffentlichte Kamm seine *in vitro* Forschungsergebnisse, in denen er die verbesserte dermale Aufnahme eines Zyklopetid-Antagonisten an einer speziellen Darmzelllinie untersuchte⁶⁰. Für eine Aktivierung von Oligonukleotiden setzte Junghans FITC-Nanopartikel ein⁵⁸, damit sie von menschlichen Retikulumzelllymphomen schneller und besser aufgenommen werden. Merodio arbeitete ebenfalls mit Fluoreszenz markierten Nanopartikeln. Er wollte nachweisen, dass bei Krankheiten, bei denen die Blut-Hirn-Schranke geschädigt ist, wie z.B. Multiple Sklerose oder Allergische Enzephalomyelitis, diese Schädigungen und Demyelinisierungen durch Albumin-Nanopartikel erkennbar gemacht werden können⁸⁵. Eine Quantifizierung der Aufnahme von verschiedenen FITC-Nanopartikeln führte Hussain durch⁴⁹, indem er eine fluorometrische Methode angewendete. In seinen Versuchen verwendete er Leber- und Milzgewebe von Nagetieren. Ai führte 2002 ein „Coating“ von Blutzellen mit Silica- und Fluoreszenz-Nanopartikeln durch¹, was er durch TEM und Fluoreszenzmikroskopie veranschaulicht hat. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, diese markierten Blutzellen zur Verabreichungen von Arzneimitteln bei herzchirurgischen Eingriffen einzusetzen. Auch mit Nanopartikeln als Arzneimittelträgerstoff beschäftigte sich Bharali⁹, indem er spezielle Nanopartikel für hydrophile Arzneimittel entwickelte. Ausserdem ist die *in vitro* Arbeit von Huang zu erwähnen, in der er FITC-Chitosan-Nanopartikel verwendete, um die Aufnahme von Nanopartikeln in spezielle menschliche Epithelzellen des Respirationstraktes zu zeigen⁴⁶.

2.3.6 Fourier Transform Infrared Analyse

Eine weitere, häufig erwähnte Analyse zur Charakterisierung von SPN ist die „Fourier transform infrared“-Analyse (FT-IR Analyse) ²⁵. Bei diesem Verfahren wird ein Infrarotspektrum eines Stoffes (z.B. SPN) aufgezeichnet, aus der Art und Zusammensetzung des Stoffes ermittelt werden können. Kim beschreibt diese Methode neben der TEM und der „nuclear magnetic resonance spectroscopy“(NMRS), um spezielle Nanopartikel als leberspezifische Arzneimittelträger zu charakterisieren ^{63, 64}. Ähnliche Studien führte Lee mit Nanopartikeln durch, die mit Fettsäuren und Polyethylenglycol beladen waren, um die SPN als Trägerstoff für Arzneimittel einzusetzen ⁷². Dafür setzte er die gleichen Charakterisierungsmethoden wie Kim ein. Weitere Wissenschaftler, die das FT-IR eingesetzt haben waren Markowitz ⁸⁰ und Resmi ¹¹², die mit Gold-Nanopartikeln experimentierten, sowie Wu ¹⁴⁰, der Barium-Titan-Nanopartikel, und Evans ³¹, der Silicium-Nanopartikel mit dieser Methode untersuchte. Als zusätzliche Methoden setzten alle das „X-Ray Diffraction“ (XRD) ein, welches im nachfolgenden Kapitel näher erläutert wird.

2.3.7 „X-Ray Diffraction“ (XRD)

Eine häufig genutzte physikalische Methode ist die XRD-Methode ¹⁷. Hierbei wird die kristalline Struktur, d.h. die räumliche und die atomare Anordnung ⁷³ der einzelnen Partikel mittels eines monochromatischen Röntgenstrahles gemessen. Aus dem durch die Messung erhaltenen Röntgenbeugungsmuster der SPN lässt sich neben der Zusammensetzung auch mit Hilfe der Scherrer-Formel etwas über die Grössenverhältnisse der SPN aussagen ^{24, 25}. Meist wird diese Art des Nachweises bei der Herstellung von SPN eingesetzt, um zu überwachen, ob und wie sich die Partikel durch Bindung spezifischer Gruppen oder Stoffe (z.B. Lipase) verändern ^{29, 47, 57}. Als ergänzende Untersuchung wird in den Veröffentlichungen von Jung ⁵⁷ und von Huang ⁴⁷ zusätzlich TEM eingesetzt, wodurch die Partikeleigenschaften besser beurteilt werden können.

2.3.8 SQUID-Magnetometer

Zur Charakterisierung von SNP wird neben dem XRD ebenfalls das SQUID- („superconducting quantum interference device“)-Magnetometer eingesetzt. Dabei werden vor allem die magnetischen Eigenschaften bzw. magnetische Felder der Partikel gemessen^{8, 24, 73}. Diese Methode besitzt eine hohe Sensitivität, indem es den „Josephson Effect“ ausnutzt und neben der Messung von magnetischen Teilchen, auch zur Messung von schwachen biomagnetischen Feldern von Herz und Gehirn verwendet werden kann^{8, 73}. Damit lassen sich magnetische Größen, wie Ströme, Spannungen, Flüsse und Feldstärken messen. Mittels der ermittelten Daten der Magnetisation lassen sich die durchschnittlichen Partikelgrößen und deren Verteilungen errechnen. So führte z.B. Woods eine Messung der superparamagnetischen Eigenschaften bei Kobalt-Nanopartikeln durch, indem er das SQUID verwendete¹³⁹. Jamet wendete ein „SQUID“ an, um ein „Cluster“ aus Cobalt-Nanopartikeln zu charakterisieren⁵¹. Ein anderes Einsatzgebiet beschreibt Chemia, der das SQUID in Verbindung mit SNP verwendete, um Immunoassays zu charakterisieren¹⁸. Auch Park benutzte SQUID um Kobalt-Platinum Nanopartikel zu charakterisieren, wobei ihm diese Methode als Ergänzung zu TEM und XRD diene¹⁰¹.

2.3.9 „Mapping Local Susceptibility“

Diese Methode der mikroskopischen Messung von magnetischer Ladung in einem Gewebe wird erst sehr selten eingesetzt. Mit diesem Messgerät ist es möglich, zwei Komponenten, nämlich die magnetische Stärke und auch deren räumliche Verteilung, zu messen und bildlich sichtbar zu machen¹²⁴. Die magnetische Feldstärke wird in eine Farbskala übertragen, sodass ein zweidimensionales Muster der magnetischen Verteilung der Probe erzeugt wird¹²⁵. Bowen wendete diese Methode an, um Eisenoxid-Nanopartikel in speziellen, menschlichen, leukämischen Monozytenzellen (THP-1) zu messen. Dabei wurden Eisenoxid-SNP und ultra-kleine Eisenoxid-SNP verwendet, die in verschiedenen Konzentration über unterschiedliche Zeiträume hinweg mit den Zellen *in vitro* inkubiert wurden¹⁴.

2.3.10 Magnet Resonanz Tomographie (MRT)

Das Haupteinsatzgebiet von SPN wird, wie schon bereits erwähnt, zur Zeit vornehmlich als Kontrastmittel zu diagnostischen Zwecken gesehen. Unzählige Wissenschaftler haben darüber berichtet, wobei im Folgenden nur eine spezielle Auswahl dieses Forschungsbereichs vorgestellt wird^{4, 7, 12, 20, 21, 26, 35, 68, 94, 96, 106, 121, 138, 144}. Allen voran steht die MRT, wobei auch in der Szintigraphie derartige Partikel eingesetzt werden (siehe Kapitel 2.3.11). Um bei der Alzheimer's-Krankheit, bei der Plaques aus Amyloid- β im Hirn vorhanden sind, diese Plaques mittels eines bildgebenden Verfahrens sichtbar zu machen, wurde dafür ein „magnetic resonance microimaging“ (MRMI) entwickelt¹³³. Dabei werden „dextran-coated“ monokristalline Eisenoxid Nanopartikel an ein Peptid (A β 1-40) gebunden, welche ein sehr hohes Bindungsvermögen zu Amyloid- β aufweisen. Nach intravenöser Injektion dieser Partikel findet eine Bindung mit dem Amyloid statt und wegen der magnetischen Eigenschaften der Partikel ist es möglich, diese im MRT sichtbar zu machen. Der Versuch wurde an transgenen Mäusen durchgeführt, welche die Amyloid- β -Plaques im Gehirn aufweisen. Mittels MRT mit SPN als Kontrastmittel konnte Masui auch sehr frühe Schädigungen in der Leber von Mäusen zeigen, die durch Röntgenstrahlen entstanden waren⁸³.

MRT mit Dextran stabilisierten SPN wird ebenfalls eingesetzt, um Genexpressionen bei lebenden Tieren sichtbar zu machen^{44, 137}. Bei der ersten Studie handelte es sich um eine *in vitro* Studie, bei der zweiten um eine *in vivo* Arbeit mit Mäusen. Der Vorteil im Vergleich zu vorher angewandten „nuclear imaging“-Methoden liegt darin, dass das MRT ein weit höheres Bildauflösungsvermögen besitzt. In beiden Veröffentlichungen wurde die Expression eines Transferrinrezeptors sichtbar gemacht, der die Aufnahme von den speziell präparierten SPN in Zellen anzeigt. Auch in der Gentherapie werden SPN angewandt. So zeigte Moore⁸⁷, wie „crosslinked“ Eisenoxid-Nanopartikel Immunzellen mit MRT sichtbar gemacht werden können. Moore bezieht sich auf den Typ I Diabetes mellitus, bei dem autoimmun bedingt, zytotoxische Lymphozyten die Insulin produzierenden β -Zellen der Bauchspeicheldrüse zerstören. Mit den SPN als Kontrastmittel für MRT können somit die entarteten Lymphozyten bildlich dargestellt und deshalb eine frühzeitige Erkennung des Diabetes Mellitus vom Typ I erreicht werden.

Eine weitere Möglichkeit des Einsatzes von SPN als Kontrastmittel für MRT beschrieb Schmitz¹²¹. Er wies damit bei Kaninchen post mortem entzündlich veränderte

atherosklerotische Plaques in Gefäßwänden nach. Als Vergleichsmethoden zur Beurteilung dieser Arterienverkalkung führte er eine Radiographie und die Färbung histologischer Schnitte mittels Berliner-Blau-Reagenz durch.

Ein anderes Einsatzgebiet wurde von Reese untersucht ¹¹⁰. Er setzte für die MRT Eisenoxid Nanopartikel ein und zeigte, welche Veränderungen in der Gehirndurchblutung bei Ratten auftreten, nachdem Bicuculline, ein als Antiepileptikum eingesetzter GABA_A-Antagonist intravenös verabreicht wurde.

Um fokale Leberläsionen zu diagnostizieren, verglich Helmberger ⁴³ die Methode der kontrastmittelverstärkten Computertomographie, die native und die mit einem SPN-verstärkten MRT miteinander. Dabei stellte sich heraus, dass sich die SPN-MRT als bestes diagnostisches Mittel für diesen Einsatz darstellt, was die Ergebnisse von zeitlich früheren Studien ^{6, 34, 54, 115} bestätigte.

2.3.11 Szintigraphie

Die Szintigraphie stellt ein bildgebendes Verfahren unter Verwendung von Radionukliden oder mit Radionukliden markierten Pharmaka dar ¹¹³. Radioaktiv markierte Nanopartikel können somit auch in der Szintigraphie eingesetzt werden.

1993 führte Ghanem szinigraphische Untersuchungen an Menschen durch, indem er „Polycyanoacrylat Nanopartikel“, die mit Indium und Technetium markiert waren, als Kontrastmittel einsetzte ³⁶. Terrier ¹²⁸ setzte die Nachweismethode der SPN ein, um die MRT-Bilder, die er in seinen Versuchen machte zu bestätigen. Er wollte mit seinen Experimenten den Effekt von arterieller Ischämie auf die Phagozythoseaktivität von Lebermakrophagen bei Meerschweinchen untersuchen. Als weitere Nachweismethoden wandte er die Histologie und Leberenzymmessungen an. SPN als Träger- und Transportstoff für Arzneimittel gegen Krebs wird von einigen Wissenschaftlern als interessantes Thema verfolgt und die Szintigraphie wird dabei häufig als Nachweismethode beschrieben ^{71, 132}.

Videira ¹³² beobachtete die Aufnahme von SPN, die mit radioaktivem Technetium markiert waren, in den Atmungsapparat beobachtet. Die Absicht bestand darin, einen besseren Trägerstoff bei der Therapie von Lungenkrebs und Lungenmetastasen zu entwickeln. Eine ähnliche Studie wurde von Laverman ⁷¹ durchgeführt. Das Ziel bestand darin, die Leber- und

Milz-Makrophagen und deren Aktivität bildlich sichtbar zu machen, um einen Ansatz bei der Krebstherapie und auch der Diagnostik zu haben.

Mit der Verteilung von Nanopartikeln beschäftigte sich He⁴², indem er Mäusen SPN in die Schwanzvene injizierte und mittels der Szintigraphie die Verteilung im Körper nach 30 Minuten und 2 Stunden beobachtete. Er verglich diese Messdaten mit den Daten der Verteilung nach subkutaner Injektion.

2.4 Synthese und „Coating“ von SPN

Bei den Synthesarten und der anschliessenden Funktionalisierung, auch „Coating“ genannt, lassen sich drei verschiedene Methoden unterscheiden: 1.) „Coating“ nach chemischer Präzipitation, 2.) „Coating“ während chemischer Präzipitation und 3.) Synthese mittels Mikroemulsion²⁴.

Unter dem „Coating“-Vorgang wird die Anlagerung von Molekülen an das Grundgerüst des Partikels und damit die Stabilisierung und Spezifizierung für den späteren, speziellen Einsatz verstanden.

Bei der Herstellung von Nanopartikeln entstehen immer polydisperse Mikroemulsionen, die erst durch Reinigung und Grössensortierung für medizinische Zwecke eingesetzt werden können. Diese Umwandlung einer polydispersen in eine monodisperse Lösung beschreibt Massart⁸².

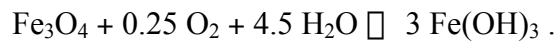
2.4.1 „Coating“ nach chemischer Präzipitation von SPN

Bei der Synthese von SPN ist die Hauptreaktion die Ausfällung von schwarzem Fe₃O₄. Dabei stellt sich die chemische Reaktion der Partikel folgendermassen dar:



Eine vollständige Ausfällung wird bei einem pH-Wert zwischen pH 7.5 und pH 14 erreicht.

Es ist zu beachten, dass unter nicht oxidierenden Verhältnissen Fe²⁺ und Fe³⁺ im Verhältnis 1:2 auftritt. Ist die Möglichkeit einer Oxidation vorhanden, wird Fe³⁺ sofort zu Fe²⁺ umgewandelt. Dies geschieht nach folgender Gleichung:



Wässrige Dispersionen von SPN wurden in der Weise präpariert, dass eine Lösung aus Fe(II)- und Fe(III)-Salzen durch Ammoniak⁶¹ oder Natronlauge²⁴ auf ein alkalisches Niveau gebracht wurden⁸¹.

Beim Herstellungsprozess wird die Eisenlösung bei Raumtemperatur tropfenweise in die oben erwähnte alkalische Lösung pipettiert, wobei das Gemisch bei 2000rpm kräftig zentrifugiert wird. Bei diesem Vorgang fällt ein schwarzer magnetischer Niederschlag an, der die SPN darstellt. Um die Partikel vom Rest der Lösung zu trennen, wird der Niederschlag durch ein externes Magnetfeld am Boden des Gefäßes konzentriert und der Überstand abgeschüttet.

Der anschließende Reinigungsprozess erfolgt in der Weise, dass das Präzipitat 4x mit speziellem, durch Einströmung von N₂-Gas deoxygeniertem „Milli-Q“-Wasser vermischt, anschliessend bei 3500rpm zentrifugiert und die überstehende Lösung abgeschüttet wird.

Nach dem Waschvorgang folgt die Neutralisierung der Partikel durch Zugabe von HCl (0.01M), wodurch die negative Ladung der Partikeloberfläche neutralisiert wird.

Ein eventuell anschliessendes „Coating“ der Partikel erfolgt mit spezifischen Lösungen, die oberflächenaktive Substanzen enthalten. Diese Lösungen werden bei 90°C für 30min bei starkem Umrühren zu den gereinigten, neutralisierten Partikeln gegeben. Dieser „Coating“-Vorgang führt zu einem physikalischen Zusammenhalt der oberflächenaktiven Substanz und der Partikel. Das „Coating“ kann durch mehrmaliges Waschen mit „deoxygeniertem Milli-Q-water“ wieder rückgängig gemacht werden. Eine sehr ähnliche Synthesemethode beschreibt Chastellain¹⁷. Er verwendet Fe²⁺ - und Fe³⁺ -Chlorid-Lösungen, die er mittels alkalischer Kopräzipitation reagieren lässt. Nach mehrmaligem Waschen mit destilliertem Wasser, wodurch sich der pH-Wert auf 7 einpendelt, erfolgte ein Rückfluss in Salpetersäure und Fe(NO₃)₃·9H₂O, der die schwarze Lösung braun färbte. Als letzter Schritt wurde die Lösung nach dem Zentrifugieren mit Polyvinylalkohol (PVA) gemischt, um die Partikel zu stabilisieren.

2.4.2 „Coating“ während chemischer Präzipitation ³²

Diese andere Synthesemethode wird anhand von Stärke erklärt. Im Versuch selber können, anstelle von Stärke auch PVA^{17, 98}, Dextran^{17, 98}, Dextrin, PEG, MPEG und Eiweiss an die Partikel gebunden werden, um später spezifische chemische Gruppen zu binden.

Zu Beginn wird eine Stärkelösung hergestellt. Hierzu wird Stärke bei 90°C in entionisiertem Wasser gelöst und auf 60°C abgekühlt. In diese Lösung wird die eisenhaltige Lösung bei starkem Rühren eingetropft. Die entstehende Stärke-Eisen-Lösung wird anschliessend in 60°C warme NaOH-Lösung (1.0M) tropfenweise und unter heftigem Rührvorgang (2000rpm) eingebracht.

Der Vorgang wird so lange durchgeführt, bis 50% des Wassers verdunstet ist. Das entstehende Gel wird mit entmineralisiertem Wasser gewaschen, bis sich ein gewünschter pH-Wert einstellt. Die entstandene Stärke SPN kann anschliessend z.B. mit BSA (bovine serum albumin) konjugiert werden.

2.4.3 Synthese mittels Mikroemulsion ⁶⁶

Die Methode der Synthese mittels Mikroemulsion basiert vor allem auf einer Mischung von zwei Mikroemulsionen bei 65°C.

Mikroemulsion I (M I) besteht aus einer ungeladenen, oberflächenaktiven Substanz (Brij@97), Cyclohexan und Eisensalzen (FeSO₄ (1.28M), FeCl₃ (0.64M)) und Salzsäure (0.4M), wobei die Salzsäure zugeführt wird, um die Fe²⁺ in Fe³⁺ zu oxidieren.

Mikroemulsion II (M II) enthält im Gegensatz zu M I keine Eisensalze und eine 20% höhere Konzentration an Cyclohexan. Die Zugabe von Cyclohexan bewirkt eine Erhöhung des pH-Wertes ins Alkalische und damit die Fällung der Eisensalze.

Nachdem M I und M II getrennt voneinander auf 65°C erhitzt werden, wird M I tropfenweise unter starkem Rühren in M II gegeben und anschliessend auf Raumtemperatur gebracht. Der anschliessende Waschprozess erfolgt durch Anlegen eines externen Magneten und Abgiessen des Überstandes. Als Waschlösung wird ein Gemisch aus Aceton und entmineralisiertem Wasser verwendet.

Die verwendeten Partikel in der vorliegenden Studie wurden nach den Syntheseverfahren von Absatz 2.4.1 und 2.4.2 hergestellt. Die Partikel von Mikromod und KTH wurden somit erst nach der chemischen Präzipitation (Absatz 2.4.1) funktionalisiert, währenddessen die Partikel der EPFL und von Liquid Research nach Methode 2.4.2, d.h. während der chemischen Präzipitation mit funktionellen Stoffen und Gruppen stabilisiert wurden. Die genauen Arten der verschiedenen eingesetzten Partikel kann aus dem Kapitel 3.2.1 entnommen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Monolayer-Zellkulturen

3.1.1 **Verwendete Zellen**

In den Versuchen wurden Synovialzellen, Chondrozyten und Osteoblasten eingesetzt.

Es handelte sich um Primärzelllinien, wobei jede dieser Zelllinien ca. ein Jahr zuvor im Rahmen der Dissertation von Neuberger⁹² aus Schafgelenken entnommen, angezüchtet, kultiviert und in einem Tiefgefrierschrank [Legaci, Copeland, Ashville, North Carolina, USA] bei -80°C schockgefroren wurde.

3.1.2 **Verwendete Chemikalien und Geräte:**

Zur Kultivierung der Zellen wurden ausschliesslich sterile Nährlösungen verwendet, die zuvor durch Vakuumfilter von [Sarstedt, 51588 Nümbrecht, Deutschland] filtriert wurden.

Sämtliche Lösungen wurden vor dem Kontakt mit den Zellen im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Alle Arbeiten mit den Zellkulturen wurden unter einem „Laminar Flow“ [Korbin Instrumente AG Basel, 4132 Muttenz] ausgeführt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO_2 - und Wasser ummantelten Inkubator [Forma Scientific, Marjetta, USA] bei 37°C und 5% CO_2 .

Liste der verwendeten Chemikalien und Geräte:

Absaugeinheit	[Inotech, Schweiz]
Ascorbinsäure	[Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]
Auflichtmikroskop Olympus Tokyo	[Weidmann & Sohn, Schweiz]
Auslaufpipetten (2, 5, 10, 25ml)	[Sarstedt, Deutschland]
Coverslips Thermanox	[Nunc TM , Naperville, IL, USA]
Eppendorfgefässe	[Semadeni AG, Ostermündingen, Schweiz]
Eppendorfpipetten (10-1000 μl)	[Synmedic AG, Schweiz]
FBS	[Life Technologies, Paisley, UK]

GBSS	[Sigma, Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland]
Glasflaschen (100, 200, 500, 1000ml)	[VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland]
Glasstäbe (Ø 6mm)	[VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland]
Inkubator	[Forma Scientific, Marjetta, USA]
3-Kammer-Maskenobjektträger	[Semadeni AG, Ostermündingen, Schweiz]
Kollagenase (273U/mg)	[Worthington, Lakewood, USA]
6-Loch-Platten	[Semadeni AG, Ostermündingen, Schweiz]
Magnete	[VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland]
Methanol (100%)	[Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]
Mikro-Tuben (1,5ml)	[Semadeni AG, Ostermündingen, Schweiz]
Neubauer Zählkammer	[Semadeni AG, Ostermündingen, Schweiz]
Pasteurpipetten	[Hilgenberg, STADT??, Deutschland]
Penicillin / Streptomycin	[Life Technologies, Paisley, UK]
Petrischalen (Ø 20cm)	[VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland]
Pinzette	[VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland]
Pipettenspitzen (2-200µl; 100-1000µl)	[Semadeni AG, Ostermündingen, Schweiz]
Pipettierboy	[Tecnomara AG, Schweiz]
Schere	[VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland]
Spatel	[VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland]
Spritzenfilter (0.22µm)	[Millipore, Bedford, MA, USA]
Thermometer	[VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland]
Trypanblau	[Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]
Trypsin (214U/mg)	[Forma Scientific, Marjetta, USA]
Vacuumfilter 250ml/500ml(0,22µm)	[Sarstedt, Deutschland]
Wasserbad	[Labtronic 35]
Zellkulturflaschen (25, 75ml)	[Corning Incorporated, NY 14831, USA]
Zentrifugenröhrchen (15, 50ml)	[Corning Incorporated, NY 14831, USA]
Zentrifuge Rotanta 46 RS	[Hettich, Tuttlingen, Deutschland]

3.1.3 Synovialzellen (SZ)

3.1.3.1 Spezielles Material

Zur Kultivierung von SZ wurden folgende drei Lösungen nach angegebenem Verhältnis zusammengestellt und verwendet:

<u>Lösung I:</u>	F-12	90ml
	FBS	9ml
	P/S	1ml
<hr/>		
<u>Lösung II:</u>	GBSS	100ml
	Kollagenase (273 U/mg)	80mg
	Trypsin (214 U/mg)	100mg
<hr/>		
<u>Lösung III:</u>	FBS	90ml
	DMSO	10ml

3.1.3.2 Auftauen

Zum Auftauen der SZ wurde 1ml der tiefgefrorenen Zellsuspension (ca. 1 Mio. Zellen) im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, in ein Falconröhrchen mit 10ml der Lösung I gegeben und bei 900 RPM 8 Minuten lang zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet mit 10ml der Lösung I gewaschen. Anschliessend wurden 50µl der Zellsuspension mit 50µl Trypanblaulösung gefärbt, um die absolute Zellzahl der Lösung mit der Neubauer Zählkammer zu bestimmen. Die Errechnung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Absolute Zellzahl} = \frac{\text{Zellzahl in } 4 \times 16 \text{ Quadranten} \times 2 \times 10^4}{\text{Anzahl der Quadranten (=4)}}$$

3.1.3.3 Vorkultivierung in Zellkulturflaschen

Um die aufgetauten Zellen für die späteren Versuche zu vermehren, wurden jeweils ca. 5×10^5 Zellen in Zellkulturflaschen (75ml) mit 35ml der Lösung I überschüttet und bei 37°C inkubiert. Alle 2 bis 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel mit Lösung I, indem die verbrauchte Nährlösung mit Hilfe von Pasteurpipetten und einer Absaugeinheit entzogen und 35ml der frischen Lösung I mittels Auslaufpipetten und einem Pipettierboy zugesetzt wurde. Diese Vorkultivierung dauerte 1,5 bis 2 Wochen, je nach Wachstum der Zellen, bis der gebildete Zellrasen begann sich am Rande abzulösen.

3.1.3.4 Hauptkultivierung in 6-Loch-Platten / auf 3-Kammer-Objektträgern

Zur Vorbereitung der Zellen für die Kultivierung in 6-Loch-Platten und auf 3-Kammer-Objektträgern (3-K-OT), wurde das Nährmedium (Lösung I) über dem Zellrasen in den Zellkulturflaschen abgesogen. Stattdessen wurde der Monolayer mit 20ml der Lösung II überschichtet, damit sich nach einer Inkubationszeit von einer Stunde die Zellen einzeln vom Flaschenboden ablösen.

Anschliessend wurde das Gemisch aus abgelösten Zellen und Lösung II mittels Auslaufpipetten abgesaugt und in Falconröhrchen (50ml) gegeben. Eine Nachspülung des Zellflaschenbodens erfolgte mit 10ml der Lösung I, um alle Zellen aus den Flaschen zu gewinnen. Diese Spülflüssigkeit wurde ebenfalls in das Falconröhrchen pipettiert. Im nächsten Schritt erfolgte das Waschen der Zellen, indem sie bei 900 RPM 8min zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet wurde. Anschliessend wurde das am Röhrchenboden klebende Pellet mit 20ml der Lösung I resuspendiert und die Zellhaufen durch mehrmaliges einsaugen und auslaufen lassen mittels Pipetten wieder vereinzelt. Dieser Vorgang des Zentrifugierens, Dekantierens und Resuspendierens wurde dreimal wiederholt. Als letzter Schritt erfolgte die Vereinzelnung des Zellpellets mit 10ml der Lösung I, um dann eine Zellzählung mit der Neubauer Zählkammer, wie sie unter Punkt 3.1.3.2 beschrieben ist, durchzuführen.

Die Zellen wurden dabei ebenfalls noch für spätere Versuche angesetzt. Dafür wurden **6-Loch-Platten** mit 2ml der Lösung I gefüllt und jedes Loch mit je einem Coverslip bestückt. Anschliessend wurde in jedes Loch auf dem Coverslip eine Zellzahl von ca. 5×10^5 gegeben und die Platten für 3 Tage inkubiert.

Um den Zellrasen auf **3-Kammer-Objektträgern** zu züchten, wurden je 10 Objektträger auf Glasstäben ($\varnothing 6\text{mm}$) in eine Petrischale ($\varnothing 20\text{cm}$) gelegt und der Boden der Schale mit 12ml

Aqua_{dest} bedeckt (siehe Abb. 3.1(a) und 3.1(b)). Anschliessend wurden auf jede Kammer je 150 μ l der Zellsuspension gegeben, die auf eine Konzentration von ca. 5×10^5 Zellen/ml eingestellt worden war. Die Menge wurde so eingestellt, dass die Flüssigkeit über den Kammern durch die Oberflächenspannung der einzelnen Tropfen nicht verlaufen konnte. Nach dem Aufsetzen des nicht luftdichten Petrischalendeckels erfolgte ebenfalls für einen Zeitraum von 3 Tagen die Inkubation.

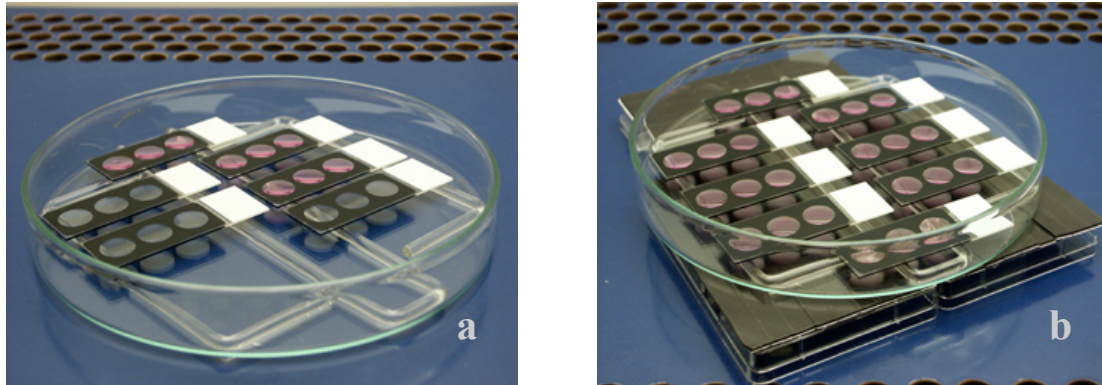


Abb. 3.1(a) und 3.1 (b): Zellkultivierung in Petrischalen auf 3-Kammer-Objektträgern ohne (a) und mit (b) Magnet

Von den restlichen Zellen in Suspension, die nicht zur Hauptkultivierung eingesetzt wurden, wurden neue Zellkulturen in Flaschen angesetzt, um die Zelllinie zu erhalten. Es wurden dafür, so wie unter Punkt 3.1.3.3 beschrieben, jeweils ca. 5×10^5 Zellen in jede Flasche (75ml) mit 35ml Lösung I gegeben.

Desweiteren wurden Zellen, die zu diesem Zeitpunkt keine Verwendung fanden, für spätere Versuche eingefroren. Dieser Vorgang wird im folgenden Absatz (Kapitel 3.1.3.5) behandelt.

3.1.3.5 Einfrieren

Die abgelösten, zentrifugierten, gewaschenen und gezählten Zellen, wurden wiederum zentrifugiert (8 Min 900RPM) und die überstehende Flüssigkeit dekantiert. Anschliessend wurden die Zellen mit einer entsprechenden Menge Lösung III resuspendiert, so dass sich eine Endkonzentration der Suspension von 1×10^6 Zellen/ml einstellte.

Je nach Menge der einzufrierenden Zellen, wurden je 1ml der Zell-Gefrierlösungs-Suspension in ein Kryoröhrchen (1,5ml) pipettiert und in flüssigem Stickstoff bei -196°C , zwei Minuten lang, schockgefroren, bevor sie bei -80°C langfristig tiefgefroren wurden.

3.1.4 Chondrozyten (CZ)

3.1.4.1 Spezielles Material

Es wurden die gleichen drei Lösungen wie bei den SZ (Kapitel 3.1.3.1) verwendet.

3.1.4.2 Auftauen

Das Auftauen der CZ erfolgt nach dem gleichen Schema wie bei den SZ (siehe Kapitel 3.1.3.2)

3.1.4.3 Vorkultivierung in Zellkulturflaschen

Die Kultivierung in Zellkulturflaschen wurde in gleicher Weise durchgeführt, wie bei SZ (Punkt 3.1.3.3) beschrieben. Der einzige Unterschied bestand darin, dass der Zellrasen bei CZ erst mit 2,5 bis 3 Wochen vollständig war, und so die Ablösung und Hauptkultivierung ca. eine Woche später erfolgte.

3.1.4.4 Hauptkultivierung in 6-Loch-Platten / auf 3-Kammer-Objektträgern

Der Ansatz der CZ in 6-Loch-Platten und auf 3-Kammer-Objektträgern wurde auf gleiche Weise durchgeführt wie bei den SZ (vergleiche Kapitel 3.1.3.4).

3.1.4.5 Einfrieren

Der Vorgang des Einfrierens der gewaschenen, gezählten und resuspendierten CZ erfolgte auf dieselbe Art und Weise wie bei den SZ beschrieben (siehe Punkt 3.1.3.5).

3.1.5 Osteblasten (OB)

3.1.5.1 Spezielles Material:

Zur Kultivierung von Osteblasten wurde es notwendig noch vier weitere Lösungen vorzubereiten.

<u>Lösung IV:</u>	BGJ _b	45ml
	DMEM	45ml
	FBS	10ml
	Fungizon	2ml
	P/S	1ml
	Ascorbinsäurelösung (5%)	0,1ml
<hr/>		
<u>Lösung V:</u>	BGJ _b	45ml
	DMEM	45ml
	FBS	20ml
	P/S	1ml
	-Ascorbinsäurelösung (5%)	0,1ml
<hr/>		
<u>Lösung VI:</u>	GBSS	100ml
	Kollagenase (273 U/mg)	80mg
	Trypsin (214 U/mg)	100mg
<hr/>		
<u>Lösung VII:</u>	FBS	90ml
	DMSO	10ml

3.1.5.2 Auftauen

Beim Auftauen der OB wurde im Prinzip in gleicher Weise verfahren wie bei den SZ und den CZ (vgl. Kapitel 3.1.3.2), mit dem Unterschied, dass Lösung I durch Lösung V ersetzt wurde.

3.1.5.3 Vorkultivierung in Zellkulturflaschen

Es wurden jeweils 5×10^5 Zellen, so wie es in Absatz 3.1.3.3 beschrieben ist, in Zellkulturflaschen angesetzt. Wie bereits beim Auftauen wurde ebenfalls bei der Vorkultivierung anstelle der Lösung I die Lösung IV verwendet. Nach ca. einer Woche *in vitro* Zellkultivierung musste anstelle des Nährmediums (Lösung IV) die Lösung V, ohne Funguzon, verwendet werden. Die Dauer der Vorkultivierung von OB in Zellkulturflaschen betrug bis zur Bildung eines geschlossenen Monolayers ca. 2,5 bis 3 Wochen.

3.1.5.4 Hauptkultivierung in 6-Loch-Platten / auf 3-Kammer-Objektträgern

Zur Kultivierung in 6-Loch-Platten und auf den 3-Kammer-Maskenobjektträgern wurde statt der Lösung I die Lösung V verwendet. Alle anderen Schritte sind denen der SZ von Kapitel 3.1.3.4 identisch.

3.1.5.5 Einfrieren

Um OB einzufrieren, wurden die Zellen abgelöst, gewaschen, resuspendiert und gezählt, wie es unter Punkt 3.1.3.5 beschrieben ist. Dazu wurde Lösung I durch Lösung V ersetzt.

Die Ablösung der OB erfolgte mit Lösung VI, die anschliessende Reinigung der Zellen mit Lösung V und die Resuspendierung mittels Lösung VII.

3.2 Partikelzugabe, Inkubation mit Magneten und Fixierung der Zellen

3.2.1 Getestete SPN

Im Folgenden wird aufgezählt, welche Partikel in den Vor- und den Hauptversuchen verwendet wurden.

Hersteller I: (Micromod)

P1: Dextran stabilisierter Magnetit ohne weitere Ummantelung	(70nm)
P2: Dextran stabilisierter Magnetit mit Avidin-Ummantelung	(130nm)
P3: Dextran stabilisierter Magnetit mit Avidin-Ummantelung	(250nm)
P4: Dextran stabilisierter Magnetit mit Biotin-Ummantelung	(130nm)
P5: Dextran stabilisierter Magnetit mit Biotin-Ummantelung	(250nm)
P6: Dextran stabilisierter Magnetit mit Streptavidin-Ummantelung	(130nm)
P7: Dextran stabilisierter Magnetit mit Streptavidin-Ummantelung	(250nm)
P8: Dextran stabilisierter Magnetit mit Carboxyl-Ummantelung	(130nm)
P9: Dextran stabilisierter Magnetit mit Carboxyl-Ummantelung	(250nm)

Hersteller II: (EPFL)

P10: PVA stabilisiertes Eisenoxid	(70nm)
P11: nicht stabilisiertes Eisenoxid	(10nm)

Hersteller III: (KTH)

P12: Eisenoxid ohne Ummantelung	(ca.30nm)
P13: Eisenoxid mit Gold-Ummantelung	(ca.30nm)

Hersteller IV: (Liquid Research)

P14: Dextran stabilisiertes Magnetit ohne weitere Ummantelung	(10nm)
P15: Avidin stabilisiertes Magnetit	(10nm)

3.2.2 Vorversuche

Es wurden zwei Vorversuche durchgeführt (I und II), die als „Screening“ dienten, um die beste Methode der Kultivierung, Inkubation und Fixierung für den anschliessenden Hauptversuch zu eruieren.

3.2.2.1 Vorversuch I

Die unter Punkt 3.1.3.4, 3.1.4.4 und 3.1.5.4 beschriebenen, auf Coverslips in 6-Loch-Platten kultivierten Zellrasen wurden mit den SPN (Kapitel 3.2.1), die sich in Art der Herstellung, der Ummantelung, des Lösungsmittels und der chemischen Eigenschaften, als auch der Grösse unterschieden, versetzt. Die jeweilige Konzentration wurde aufgrund der durch Neuberger⁹² durchgeführten Vorversuchen auf 5mg/ml festgesetzt.

Zuerst wurde das über den mit Monolayern bewachsenen Coverslips stehende Nährmedium mit Pasteurpipetten und einer Absaugeinheit abgezogen. Anschliessend wurden 2ml der Dispersion bestehend aus Partikeln und Lösung I (bei SZ und CZ), bzw. Lösung V (bei OB) in je ein Loch zugegeben und die 6-Loch-Platten auf Magneten stehend für 3 Stunden inkubiert. Ein Loch diente als Kontrollloch und wurde nur mit der jeweiligen Nährlösung ohne Partikel befüllt. Nach der verstrichenen Zeit wurden die Coverslips mit einer Pinzette entnommen und mit PBS gespült, um die losen nicht an den Zellen haftenden Partikel abzuwaschen. Ein Teil der Coverslips wurde für 10 Minuten in Methanol (100%), ein anderer in Ethanol (100%) ein dritter Teil in Formalin (4%) fixiert. Ein vierter Teil wurde nicht fixiert. Nach der Fixierung wurden die Proben mit PBS gewaschen und an der Luft getrocknet. Anschliessend wurde ein Teil der auf den Coverslips fixierten Zellen nach drei verschiedenen Methoden gefärbt (siehe Punkt 3.3.3: Histochemie). Ein anderer Teil wurde für die Immunhistochemie, wie es in Kapitel 3.3.4 beschrieben wird, verwendet.

3.2.2.2 Vorversuch II:

Für Vorversuch II wurden die Zellen verwendet, die auf 3-Kammer-Objektträgern gewachsen waren, wie bereits in den Punkten 1.1.3.4, 1.1.4.4 und 1.1.5.4 beschrieben. Nach der mehrtägigen Inkubation wurde die überstehende, verbrauchte Nährlösung mit Pasteurpipetten abgesaugt und 150µl eines Gemisches aus Partikeln und Nährlösung (Lösung I für SZ und CZ; Lösung V für OB) auf jede Kammer pipettiert. Die Objektträger wurden auf Glasstäben, in Petrischalen zu je 10 Stück (siehe Beschreibung in Kapitel 1.1.3.4) auf einem Magneten (Abb. 3.1(b)) liegend für 3h inkubiert. Nach Ablauf der Zeit, wurden die Objektträger aus

dem Inkubator genommen und senkrecht in Tauchkörbchen gestellt. Anschliessend wurde das befüllte Körbchen mehrmals in eine Färbeküvette, die mit PBS befüllt war, eingetaucht, um die nicht an die Zellen gebundene SPN abzuspielen. Daraufhin folgte die Fixierung eines Teiles der Objektträger in Methanol (100%), eines anderen in Ethanol (100%) und eines dritten Teiles in Formalin (4%). Ein vierter Teil wurde nicht fixiert, sondern direkt getrocknet. Dazu wurde je eine Färbeküvette mit dem jeweiligen Fixierungsmittel befüllt und das mit Objektträgern bestückte Tauchkörbchen jeweils 10 Minuten hineingestellt. Nach dieser Fixierung erfolgte eine zweimalige Spülung für je 5 Minuten. Der letzte Schritt vor den histochemischen Färbungen (Kapitel 3.3.3) und der Immunhistochemie (Kapitel 3.3.4) bestand in der Lufttrocknung der Präparate.

3.3 Histochemie und Immunhistochemie

3.3.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

Zusätzlich zu den unter Punkt 3.1.2 aufgeführten Chemikalien und Geräten wurden folgende Materialien benutzt:

Ammoniumsulfidlösung (10%)	[Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]
Antiavidin-Mouse-Antikörper	[Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA]
Antimouse-Antikörper gekoppelt an FITC	[DAKO, Glostrup, Dänemark]
Deckgläser (50x24mm)	[Semadeni AG, Ostermündingen, Schweiz]
Ethanol (100%)	[Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]
Färbe-Küvette mit Tauchkörbchen	[Semadeni AG, 3072 Ostermündingen, Schweiz]
Fluoreszenz Einbettmittel	[DAKO Corporation, Carpinteria, USA]
HCL	[Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]
Kaisers Glyceringelatine	[Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]
Kaliumferrozyanid	[Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]
Kaliumferrizyanid	[Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]
Kernechtrot	[Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]
Messzylinder (250ml/500ml)	[VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland]
Methanol (100%)	[Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]
PBS	[Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]
Streptavidinantikörper gekoppelt an FITC	[DAKO, Glostrup, Dänemark]
Streptavidin-Peroxidase gekoppelt an AEC	[DAKO, Glostrup, Dänemark]

3.3.2 Vorversuche

Die Vorversuche III und IV wurden als „Screening“ genutzt, um die beste Färbetechnik, Färbemethode und Einbettmöglichkeit festzustellen.

3.3.2.1 Vorversuch III

In diesem Vorversuch wurden die fixierten Zellen, die auf Coverslips gewachsen und mit Partikeln inkubiert waren (Vorversuch I) verwendet. Vor der Durchführung der drei histologischen Färbungen (Absatz 3.3.3) mussten die Coverslips mittels Kaisers Glyceringelatine auf je einem Objektträger befestigt werden. Diese mit den runden Coverslips beklebten Objektträger wurden anschliessend zu je 10 Stück in Tauchkörbchen gestellt, um sie später in die speziellen Färbelösungen eintauchen zu können.

3.3.2.2 Vorversuch IV

Dieser Vorversuch wurde mit den 3-Kammer-Objektträgern durchgeführt, die aus Vorversuch II stammen. Zur Färbung der Präparate mittels Histochemie (Kapitel 3.3.3) wurden je 10 der 3-K-OT in Färbekörbchen gestellt, damit sie später in die jeweiligen Färbeküvetten getaucht werden konnten. In diesen Färbeküvetten befanden sich die verschiedenen Färbe- und Spülchemikalien.

3.3.3 Histochemie

Zusammenfassend kann über die histochemischen Färbungen gesagt werden, dass sämtliche Färbe- und Spüllösungen in Färbeküvetten gefüllt wurden

Der Färbeprozess wurde bei Präperaten, obwohl verschieden kultiviert, inkubiert, fixiert und getrocknet, sowohl auf 3-K-OT, als auch auf Coverslips in gleicher Weise durchgeführt.

Nach der jeweiligen Färbung wurden sämtliche Objektträger mittels 37°C warmer Kaisers Glyceringelatine und mittels Deckgläsern eingedeckt.

Die Betrachtung der gefärbten Präparate erfolgte unter einem Lichtmikroskop [Leica DMR].

3.3.3.1 Berliner-Blau-Reaktion

Nach der Trocknung der Präparate wurden sie für 20 Minuten in Färbeküvetten in ein Gemisch aus Kaliumferrozyanid (2%) und HCl (2%), im Verhältnis 1:1, gestellt.

Anschliessend erfolgte eine dreimalige Spülung in Aqua_{dest.}. Im nächsten Schritt erfolgte eine zehnminütige Gegenfärbung dieser Zellkulturen mit Kernechtrotlösung bevor die Präparate dann nach einer erneuten zweimaligen Spülung mit Aqua_{dest.} eingedeckt wurden.

3.3.3.2 Turnbulls-Reaktion

Zur Färbung der getrockneten Zellrasen auf den Objektträgern, bzw. Coverslips wurde im ersten Schritt in der Turnbulls-Reaktion ein Tauchbad mit einer Lösung aus Kaliumferrizyanid (20%) und HCL (1%) für 15 Minuten durchgeführt. Das Mischungsverhältnis war 1:1. Danach erfolgte die dreimalige Spülung mit Aqua_{dest.}, bevor die Gegenfärbung zehn Minuten lang mit Kernechtrotlösung vorgenommen wurde. Der folgende Schritt bestand aus einer zweimaligen Spülung in Aqua_{dest.}, und schliesslich in der Eindeckung mit Glyceringelatine.

3.3.3.3 Quinckes-Reaktion

Bei der Quinckes-Reaktion wurden die getrockneten Präparate zuerst für 30 Minuten in eine Ammoniumsulfidlösung (10%) gestellt. Anschliessend wurde dreimal mit Aqua_{dest.} gespült, bevor eine Färbung für 15 Minuten in einem Gemisch aus Kaliumferrozyanid (2%) und HCl (2%), im Verhältnis 1:1, erfolgte. Der nächste Schritt bestand in einer dreimaligen Spülung mit Aqua_{dest.}. Das weitere Vorgehen bestand aus einer zehnminütigen Gegenfärbung mit Kernechtrotfärbung und einer anschliessenden, zweimaligen Spülung mit Aqua_{dest.}. Zuletzt erfolgte ebenso die Eindeckung der Präparate mit Glyceringelatine.

3.3.4 Immunhistochemie

Zur Sichtbarmachung der SPN mittels immunhistochemischer Methoden, wurden bei jeder Methode die Zellen so gezüchtet, wie es in den Vorversuchen I und IV beschrieben wurde, d.h. auf 3-K-OT.

Die dafür eingesetzten Partikel bestanden ausschliesslich aus einer Biotin (P4, P5), Streptavidin (P6, P7) oder Avidin (P2, P3, P15) Ummantelung.

Der Eindeckvorgang nach Abschluss eines jeden Färbeprozesses erfolgte bei allen Präparaten mit speziellem „Dako[®] Fluorescent Mounting Medium“ und je einem Deckglas.

3.3.4.1 Direkte Immunhistochemie

Die direkte Immunhistochemie wurde an Proben, die mit den Partikeln P4 und P5 inkubiert waren, durchgeführt. Dazu wurde ein Streptavidinantikörper, der an FITC gekoppelt war, mit PBS auf eine Lösung im Verhältnis 1:50 eingestellt. Auf jede Kammer des Objektträgers wurden 100 μ l der Antikörperlösung verteilt. Nach einer Inkubation über 60 Minuten bei 21°C erfolgte eine dreimalige Spülung mit PBS, bevor die Eindeckung mit je einem Tropfen „Dako[®] Fluorescent Mounting Medium“ durchgeführt wurde. Zur Beurteilung der Proben, wurden sie mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMR) bei einer Wellenlänge von 510nm betrachtet.

Weitere Proben, die mit P4 und P5 inkubiert waren, wurden mit einem anderen Antikörper versetzt. Dabei handelte es sich um eine Streptavidinperoxidase, die mit Phycoerythrin (PE) gekoppelt war. Die Menge der Antikörperlösung, die mit Hilfe von PBS im Verhältnis 1:60 hergestellt wurde, betrug pro Kammer 100 μ l. Die Einwirkungszeit der Lösung auf die Zellen betrug 60 Minuten bei 21°C. Anschliessend erfolgte die Spülung mit PBS, die Eindeckung und die Betrachtung, auf die gleiche Art und Weise wie im vorangegangenen Absatz erwähnt, mit dem Unterschied, dass PE bei einer Wellenlänge von 560nm betrachtet wurde.

3.3.4.2 Indirekte Immunhistochemie

Bei der indirekten Immunhistochemie wurden die Partikel P2, P3, P6, P7 und P15 getestet. Die Avidin ummantelten SPN (P2, P3, P15) wurden mit einem Anti-Avidin-Mouse-Antikörper als primären Antikörper (AK) und mit einem FITC gekoppelten Anti-Mouse-Antikörper als Sekundären versetzt.

Bei den Streptavidin ummantelten Partikeln (P6, P7) wurde als primärer Antikörper ein Biotin-Mouse-Antikörper und anschliessend als Sekundärer der gleiche FITC gekoppelte Anti-Mouse-Antikörper wie bei den Partikeln P2, P3 und P15, eingesetzt.

Die Vorgehensweise war bei allen Partikeln gleich und erfolgte nach folgender Methode: Die mit SNP versetzten und auf den 3-Kammer-Objektträgern fixierten Zellen wurden pro Kammer mit 100 μ l der primären Antikörperlösung versetzt. Dabei wurde die Lösung der Anti-Avidin-Mouse-AK durch PBS im Verhältnis 1:200 hergestellt und bei 21°C für 60 Minuten mit den Präparaten inkubiert. Die Biotin-Mouse-AK-Lösung reagierte unverdünnt bei 21°C, 15 Minuten lang mit den Partikeln. Nach dem mehrmaligen Spülen der Proben wurden die folgenden Schritte bei den mit Avidin und den mit Streptavidin ummantelten Partikeln in gleicher Weise durchgeführt. Jede Kammer wurde mit 100 μ l einer mit PBS auf 1:100 verdünnten Anti-Mouse-AK-Lösung versetzt und durfte für 45 Minuten bei 37°C

einwirken. Der nächste Schritt bestand im mehrmaligen Waschvorgang der Proben mit PBS und einer anschließenden, 5 Sekunden dauernden Gegenfärbung mit Ivans-Blue-Lösung. Nach wiederholtem Spülen mit PBS erfolgte die Eindeckung der Objektträger mit je einem Tropfen des Fluoreszenz Eindeckmittels. Die Betrachtung der Partikel erfolgte bei beiden Methoden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMR) bei einer Wellenlänge von 510nm.

3.4 Hauptversuch

Auf Basis der aus den Vorversuchen gewonnen Erkenntnisse wurde der Hauptversuch definiert. Dabei wurden nur die Kultivierungsmethoden, die Partikel und die Nachweismethoden verwendet, die in den Vorversuchen am aussagekräftigsten erschienen.

3.4.1 Monolayer-Zellkulturen

Für den Hauptversuch wurden alle drei Zellarten, sowohl SZ und CZ als auch OB weiter verwendet. Alle Zellen wurden so aufgetaut, vorkultiviert, abgelöst, gewaschen und gezählt wie in Kapitel 3.1 beschrieben. Um die Zellen mit den verschiedenen Partikeln zu inkubieren, wurden sie für sämtliche Nachweismethoden, ausser für die TEM, auf 3-Kammer Maskenobjektträgern als Monolayer angezüchtet. Dazu wurden die Zell-Nährlösungs-Suspensionen auf eine einheitliche Konzentration von ca. 700 000 Zellen/ml eingestellt, so dass pro Kammer mit jeweils 150 μ l Zellsuspension ca. 100 000 Zellen vorhanden waren. Die Art und Weise der Kultivierung auf diesen Objektträgern wurde bereits in den Absätzen 3.1.3.4, 3.1.4.4 und 3.1.5.4 beschrieben. Nach einer Wachstumsphase von 3 Tagen wurde das Medium abgesaugt und von 150 μ l eines Gemisches aus Zellsuspension und Partikellösung pro Kammer überschichtet. Diese zweite Inkubation kann als „Partikelinkubation“ bezeichnet werden. Die Kammer auf jedem Objektträger, die jeweils am nächsten zu dem Beschriftungsfeld lag, wurde als Kontrollfeld verwendet, bei dem die Nährlösung keine Partikel enthielt. Die anderen zwei Kammern wurden mit jeweils der gleichen Partikelkonzentration über den gleichen Zeitraum inkubiert.

Diese Partikelinkubation erfolgte mit folgenden SPN-Konzentrationen über folgende Zeiten:

Konzentration \ Zeit	2 Stunden	12 Stunden	24 Stunden	48 Stunden
2,5mg/ml				
1,25mg/ml				
0,625mg/ml				

Nachdem die jeweilige Zeit verstrichen war, wurden die nicht gebundenen Partikel mit PBS abgewaschen und die Zellen mit Methanol (100%) fixiert, wie es auch im Vorversuch II Punkt 3.2.2.2 beschrieben ist.

Die Vorbereitung der Monolayer-Zellkulturen zur Betrachtung im TEM verlief nach einem anderen Schema. Die genaue Beschreibung davon erfolgt im Kapitel 3.4.5: Physikalische Methoden unter Punkt 3.4.5.2 TEM.

3.4.2 Verwendete Superparamagnetische Nanopartikel

Da sich in den Vorversuchen herausstellte, dass sich nicht alle Partikel für alle Nachweismethoden eigneten, wurde aus Gründen der Aussagekraft, der Vergleichbarkeit und der Durchführbarkeit der Methoden beschlossen, sich im Hauptversuch auf folgende drei Partikel zu beschränken.

- P2:** Dextran stabilisierter Magnetit mit Avidin-Ummantelung (130nm)
P3: Dextran stabilisierter Magnetit mit Avidin-Ummantelung (250nm)
P15: Avidin stabilisierter Magnetit (10nm)

3.4.3 Histochemie

Die, auf den 3-Kammer-Objektträgern methanolfixierten, luftgetrockneten und mit Partikeln (P2, P3, P15) inkubierten Zellen, wurden nach den zwei folgenden histologischen Methoden gefärbt:

- a) **Berliner-Blau-Reaktion;**
b) **Turnbulls-Blau-Reaktion;**

Die genaue Durchführung dieser Färbungen erfolgte nach der gleiche Art und Weise, wie es in dem Kapitel 3.3.3: Histochemie , Absatz 3.3.3.1 und 3.3.3.2 beschrieben wurde.

3.4.4 Immunhistochemie

Um die Partikel immunhistologisch nachweisen zu können, wurden die ebenfalls auf den 3-Kammer-Objektträgern Methanol fixierten, luftgetrockneten und mit Partikeln inkubierten Zellen verwendet. Dazu wurden nur die Avidin ummantelten SPN eingesetzt. Als Nachweismethode wurde die indirekte Immunhistochemie gewählt. Der primäre Antikörper bestand aus einem Anti-Avidin-Mouse-Antikörper und als sekundärer AK wurde ein an FITC gekoppelter Anti-Mouse-Antikörper gewählt. Die praktische Durchführung der einzelnen Schritte dieser Methode wurde in Kapitel 3.3.4, Absatz 3.3.4.2: Indirekte Immunhistochemie bereits genau beschrieben und erfolgte in gleicher Weise.

Die Betrachtung der eingedeckten Proben erfolgte mittels eines „Leica DMR“-Fluoreszenzmikroskopes bei einer Wellenlänge von 510nm.

3.4.5 Physikalische Methoden

3.4.5.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

Zusätzlich zu den unter Punkt 3.1.2 und 3.3.1 aufgeführten Materialien wurden folgende benötigt:

Bleinitratlösung(10%)	[Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]
Bovines Serumalbumin (5%)	[Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]
DDSA	[Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]
Epon [®]	[Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]
Ethanol(50%, 70%, 80%, 96%, 100%)	[Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]
Glutaraldehyd (2,5%)	[Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]
Kupferblättchen	[VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland]
Medi-Mount-Eindeckmittel	[Medite, Nunningen, Schweiz]
MNA	[Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]
NaOH	[Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]
N-Benzyl dimethylamin	[Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]
OsO ₄	[Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]
Propylenoxid	[Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]
„Ultracut“-Microtom	[Reichert-Jung]
TEM: Philips CM 10 EM PW 6020	[Philips]
Tri-Natriumcitrat-Dihydratlösung(15%)	[Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz]
Zellschaber (300mm)	[Sarstedt, Deutschland]

3.4.5.2 Transmissions Elektronen Mikroskopie

Um die TEM mit den drei verschiedenen Partikeln und jeweils den drei Zellarten durchzuführen, wurden die Zellen jeweils eine Woche in Zellkulturflaschen (15ml) im Inkubator kultiviert. Für SZ und CZ wurde Lösung I, für OB Lösung V verwendet. Nach der Inkubationszeit wurde das verbrauchte Medium mit Pasteurpipetten abgesaugt und der Monolayer mit der Partikellösung in einer Konzentration von 1mg/ml wieder benetzt. Anschliessend wurden die Flaschen auf Magnete gestellt und für weitere 2 Stunden bzw. 48 Stunden inkubiert. Nach der entsprechenden Zeit wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und stattdessen der Monolayer für 5 Minuten mit 15ml Glutaraldehyd (2,5%) überschüttet, um die Zellen zu fixieren. Der weitere Schritt bestand in einer zweimaligen Spülung mit PBS, um die Zellen von überschüssigem Glutaraldehyd zu reinigen. Anschliessend wurde der Zellrasen mittels eines Zellschaber abgekratzt und zusammen mit 20ml Bovinem Serumalbumin (5%) in ein Falcontube (25ml) gegeben. Nach der darauf folgenden Zentrifugation (900RPM, 8min) wurde die überstehende Flüssigkeit abgegossen und das sich am Boden abgesetzte Zellpellet mit 20ml PBS überschüttet, bevor eine erneute Zentrifugation erfolgte. Die weitere Verarbeitung der Proben wurde im Institut für Pathologie der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich durchgeführt. Dabei wurden zunächst die Zellpellets mit OsO_4 (1%) zur Lipidfixation überschichtet. Vor der Einbettung der Proben mussten sie mit PBS gewaschen und durch eine aufsteigende Alkoholreihe mit Ethanol (50%, 70%, 80%, 96, 100%) eineinhalb Stunden lang entwässert werden. Daraufhin folgte die Infiltration zuerst mit Propylenoxid und anschliessend mit einem Gemisch aus Propylenoxid und Epon[®] (1:1). Die Herstellung der Eponblöcke, in welche die Zellpellets eingebettet wurden, erfolgte mittels eines Gemisches aus Epon[®] 812 (59g), DDSA (39g), MNA (26g) und 2ml N-Benzyltrimethylamin. Die anschliessende Polymerisierung dauerte 2,5 Tage bei 60°C. Um aus den eingebetteten Proben Schnitte herstellen zu können, wurden die Blöcke an der Spitze pyramidenförmig nachgetrimmt. Anschliessend wurden mit Hilfe eines Ultramikrotoms Semidünnschnitte (1µm) gefertigt, die mit Toluidinblau gefärbt wurden, bevor die eigentlichen Ultradünnschnitte (0,1µm) hergestellt wurden. Jeder Ultradünnschnitt wurde auf ein Kupferblättchen aufgebracht und anschliessend mittels Bleizitratlösung kontrastiert. Die Lösung wurde aus 7ml Bleinitratlösung (10%), 7ml Tri-Natriumcitrat-Dihydratlösung (15%) und 1ml NaOH (4N) hergestellt. Vor der Betrachtung im TEM mussten die Schnitte an der Luft trocknen.

3.4.5.3 Mapping Local Susceptibility

Zur Durchführung der Mapping Local Susceptibility Messmethode wurden die Zellen ebenfalls auf „3-Kammer-Objektträgern“ gezüchtet. Anschliessend wurden die Proben mit Methanol fixiert und mit einem wasser- und ethanollöslichen Lack (Medi-Mount) eingedeckt, ohne ein Deckglas aufzubringen.

Die eigentliche Untersuchung der Proben erfolgte anschliessend im Royal Institute of Technology an der Universität „Kungl Tekniska Högskolan“ (KTH) in Stockholm. Das „Local Susceptibility“-Gerät wurde entwickelt, um die reversiblen und die irreversiblen Komponenten der Magnetisation zu messen. Die unterschiedlichen Messwerte werden in unterschiedliche Farben transferiert und zu einem Gesamtbild zusammengesetzt. Die Messung erfolgte auf die Weise, dass jeweils eine Probe mittels einer Spitze abgescannt wurde. Die Spitze besteht aus zwei Induktionsspulen, die senkrecht aufeinander stehen, wobei die eine die Schreib- und die andere die Lese-Spule darstellt. Die durchgeführten Messungen erfolgten mit einer Auflösung von 75 μm und einem Raster von 150 μm x 150 μm . Das Messfeld betrug 25 Oe bei einer Frequenz von 30 kHz.

3.5 Auswertung der verschiedenen Methoden

Zur statistischen Beurteilung der Ergebnisse aus den verschiedenen Nachweismethoden wurde zur Bewertung der einzelnen Eigenschaften ein semiquantitatives Scoring System mit den Punkten 0-3 entwickelt. Bei den zu beurteilenden Eigenschaften handelt es sich um: Anzahl toter Zellen, Sichtbarkeit einzelner Partikel, Ausgespartheit des Kernes, Partikel im Zytoplasma, Zellform und allgemein die Sichtbarkeit der Partikel.

Es wurden pro Objektträger sechs beliebig angeordnete Gesichtsfelder bestimmt, an denen dann die zu beurteilenden Eigenschaften mittels der Punkte (0-3) bewertet wurden, was je Nachweismethode sich anteilig unterscheidet und in den Tabellen 3.1, 3.2 und 3.3 im Detail beschrieben ist. Aus den 6 Werten, die dadurch pro Eigenschaft entstanden sind, wurde jeweils das arithmetische Mittel errechnet und in Tabellen (siehe Anhang: Kapitel 6) übernommen.

Die Auswertung der Scoring- bzw. Bewertungstabellen wurde anschliessend mit einem rein deskriptiven Verfahren durchgeführt, da es durch die Vielfalt an verschiedenen Informationen (3 verschiedene Partikel, die über je 4 verschiedene Zeiten mit je 3 verschiedene Konzentrationen auf 3 verschiedenen Zellarten getestet und an 5 verschiedenen

Nachweismethoden beurteilt wurden), nicht möglich war, eine aussagekräftige numerische, statistische Auswertung aufzustellen.

3.5.1 Berliner-Blau-Reaktion

Um die Zellkulturen der SZ, der CZ und der OB, die mit der Berliner-Blau-Reaktion gefärbt wurden, mit dem semiquantitativen Scoring-System auszuwerten, wurden die Zellkulturansätze, die für unterschiedliche Zeiten (siehe Kapitel 3.4.1) und mit den verschiedenen Partikeln versetzt wurden (siehe Kapitel 3.4.2), nach folgenden Gesichtspunkten beurteilt (Tabelle 3.1):

Tabelle 3.1: Scoring--System zur Auswertung der Berliner-Blau- und Turnbulls-Färbung

„scores“	0	1	2	3
Anzahl toter Zellen	keine	wenige	viele	alle
einzelne Partikel sichtbar	keine	wenige	viele	alle
Ausgespartheit des Kernes	völlig bedeckt	stark bedeckt	wenig bedeckt	völlig frei
Partikel im Zytoplasma	Plasma frei	mit wenigen	mit vielen	mit sehr vielen
Zellform	fransig	stark eingefallen	gering eingefallen	prall
Sichtbarkeit der Partikel	sehr blass	blass	intensiv	sehr intensiv

3.5.2 Turnbulls-Blau-Reaktion

Die Auswertung der Turnbulls-Blau-Färbung erfolgte nach dem gleichen Schema wie bei der Berliner-Blau-Reaktion (Kapitel 3.5.1 und Tabelle 3.1).

3.5.3 Immunfluoreszenz

Die Beurteilung der, mit dem Antiavidin-mouse-AK durchgeführten, Immunfluoreszenz wurde nach dem gleichen Prinzip durchgeführt, wie bei der Berliner-Blau-Reaktion (Kapitel 3.5.1 und Tabelle 3.1) beschrieben.

3.5.4 TEM

Die Bilder, die bei der TEM entstanden sind wurden ebenfalls nach einem semiquantitativen Scoring-System ausgewertet. Die Wertung der Gesichtspunkte mit Punkten von 0 bis 3 wurde in Tabelle 3.2 dargestellt und ist mit Ausnahme der Eigenschaft: „tote Zellen“ mit dem „score“-System der Lichtmikroskopie identisch.

Tabelle 3.2: „Score“-System zur Auswertung der TEM

„scores“	0	1	2	3
einzelne Partikel sichtbar	keine	wenige	viele	alle
Ausgespartheit des Kernes	völlig bedeckt	stark bedeckt	wenig bedeckt	völlig frei
Partikel im Zytoplasma	Plasma frei	mit wenigen	mit vielen	mit sehr vielen
Zellform	fransig	stark eingefallen	gering eingefallen	prall
Sichtbarkeit der Partikel	sehr blass	blass	intensiv	sehr intensiv

3.5.5 Mapping Local Susceptibility

Bei der Beurteilung der Mapping Local Susceptibility wurde das semiquantitative „score“-System anteilig verändert. Es wurde anstelle der Zellform, die Magnetstärke beurteilt, wie auch in folgender Tabelle (Tabelle 3.3) beschrieben.

Tabelle 3.3: „Score“-System zur Auswertung der „Mapping Local Susceptibility“

„scores“	0	1	2	3
einzelne Partikel sichtbar	keine	wenige	viele	alle
Ausgespartheit des Kernes	völlig bedeckt	stark bedeckt	wenig bedeckt	völlig frei
Partikel im Zytoplasma	Plasma frei	mit wenigen	mit vielen	mit sehr vielen
Magnetstärke	dunkelblau	hellblau	gelb	rot
Sichtbarkeit der Partikel	sehr blass	blass	intensiv	sehr intensiv

4 Resultate

4.1 Monolayer-Zellkulturen

Die Kultivierung der Zellen (SZ, CZ, OB) im Vorversuch auf Coverslips in 6-Loch-Platten, wie es in den Kapiteln 3.1.3.4, 3.1.4.4 und 3.1.5.4 beschrieben ist, erbrachte im Hinblick auf das Zellwachstum gute Erfolge. Die Monolayer wuchsen nach dem Auftauen und Reinigen der Zellen sehr gut auf den Coverslips an, vermehrten sich sehr schnell und konnten anschliessend mit SPN inkubiert werden. Die Fixierung, die Färbungen und die Betrachtungen stellten sich allerdings als umständlich heraus, so dass diese Zellkultivierungsmethode für die Hauptversuche nicht mehr eingesetzt wurde. Die Zellkultur auf 3-Kammer-Objektträgern (3-K-OT) zu züchten, erwies sich als die schneller durchführbare, praktikablere und übersichtlichere Methode, um die anschliessenden Hauptversuche durchzuführen. Somit wurde in den Hauptversuchen nur diese Methode eingesetzt. In den Resultaten wird neben der Vorkultivierung in Zellkulturflaschen nur auf die Kultivierung auf den 3-K-OT eingegangen.

4.1.1 **Synovialzellen**

Aus der aufgetauten und gewaschenen Zellsuspension wurden je 5×10^5 Zellen in eine Zellkulturflasche mit 35ml Nährlösung gegeben. Bei der direkten lichtmikroskopischen Betrachtung war das Zytoplasma jeder einzelnen Zelle nach dem Auftauen sehr verringert und die SZ schwebten einzeln und frei in der Nährflüssigkeit. Nach 24 h Inkubation setzten sich ca. 50% der Zellen am Flaschenboden fest. Dabei war zu beobachten, dass sich lange Zellausläufer gebildet hatten und sich auch das Volumen des Zytoplasmas stark vermehrt hatte. Nach durchschnittlich eineinhalb Wochen Inkubation im Zellkulturschrank und mehreren Medienwechseln bildete sich ein homogener Monolayer-Zellrasen mit ca. 10×10^6 Zellen in der Zellkulturflasche. Bei längeren Inkubationszeiten kam es zu Ablösungs- und Absterbeerscheinungen der Zellen, wobei dieser Prozess vor allem am Flaschenrand zu beobachten war. Die auf diese Weise gezüchteten Zellen konnten nun entweder eingefroren oder für die Versuchsansätze der Hauptversuche (Kapitel 4.2-4.4) angesetzt werden.

Nachdem im Hauptversuch (siehe 3.4) die 150 μ l der, auf 5×10^5 Zellen/ml eingestellten, Zellsuspension auf jedes Loch der 3-K-OT gegeben wurde, bildete sich nach einem Tag

bereits ein lockeres Geflecht aus SZ. Nach zwei Tagen wurde der Zellrasen in der Mitte schon sehr dicht, wobei er randständig noch locker und durchbrochen erschien. Am dritten Tag war schliesslich ein kompletter Monolayer aus SZ entstanden, der mit den verschiedenen SPN versetzt und anschliessend nach den unter Kapitel 3.4.1 und 4.4 angegebenen Inkubationszeiten fixiert werden konnte.

4.1.2 Chondrozyten

Die Zellen wurden in gleicher Weise behandelt, wie es unter 4.1.1 beschrieben ist. Lichtmikroskopisch betrachtet zeigten sie nach dem Gefrieren ebenfalls einen verringerten Anteil an Zytoplasma und die einzelnen CZ schwebten in der Nährlösung. Nachdem sie 24 h in Zellkulturflaschen inkubiert wurden, setzten sich etwa 30% am Boden des Gefässes fest, welche nach Plasmavermehrung lange Zellausläufer bildeten. Die Ausbildung eines geschlossenen Monolayerassens am Boden dauerte im Gegensatz zu den SZ zweieinhalb Wochen, so dass man erst nach dieser Inkubationszeit Zellen einfrieren, bzw. für die Hauptversuche (Kapitel 4.2 - 4.4) ansetzen konnte. Die spätere Fixierung erfolgte nach den Zeiten, so wie es in Kapitel 3.4.1 und 4.5.2. beschrieben ist.

Die Konzentration der CZ-Suspension, die im Hauptversuch auf die 3-K-OT pipettiert wurde, entsprach mit 5×10^5 Zellen/ml der von SZ. Das Zellgeflecht war nach einem Tag sehr locker und bis zur randständigen Ausbildung eines geschlossenen Monolayers vergingen 5 Tage. Die Partikelzugabe erfolgte ebenfalls nach drei Tagen Wachstumszeit.

4.1.3 Osteoblasten

Wie schon bei den SZ und den CZ beschrieben, fanden ebenfalls 5×10^5 Zellen als Grundansatz Verwendung. Das lichtmikroskopische Bild ähnelte denen der SZ und CZ sehr, d.h. es waren nach dem Auftauprozess viele einzelne, freischwimmende und zytoplasmaarme Zellen sichtbar. Nach 24 h Inkubation waren allerdings nur ca. 20% der Zellen am Boden der Zellkulturflasche anhaftend und geschwollenes Zytoplasma mit Ausläufern zu erkennen. Die Dauer bis zur Bildung eines homogenen, dichten Monolayers betrug drei Wochen. Das Einfrieren, bzw. Ansetzen der Hauptversuche war somit erst nach drei Wochen Wachstum möglich.

Die weitere Anzucht der Zellen wurde so durchgeführt, wie bei SZ (4.1.1) und CZ (4.1.2) beschrieben, d.h. 150 µl von einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml wurden auf jede Maske der Objektträger pipettiert. Obwohl die Ausbildung eines geschlossenen Monolayers ca. 6

Tage dauerte, wurde die Partikelzugabe ebenfalls schon nach drei Tagen und die Fixierung der Zellen nach den in den Kapiteln 4.2 - 4.4 erwähnten Zeiten von 2, 12, 24 und 48 Stunden durchgeführt, um vergleichbare Versuchsansätze zu gewährleisten.

Zusammenfassend sind die wichtigsten Aussagen und Unterschiede zur Zellkultivierung in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tabelle 4.1: Ergebnisse der Zellkultivierung von SZ, CZ und OB

Zellart	Auftau-Anwachsrate	Monolayer-Bildung in Flasche nach:	Monolayer-Bildung auf 3-K-OT nach:	Partikelzugabe nach:
SZ	50%	1.5 Wochen	3 Tagen	3 Tagen
CZ	30%	2.5 Wochen	5 Tagen	3 Tagen
OB	20%	3 Wochen	6 Tagen	3 Tagen

4.2 Histochemie-Vorversuche

Die Vorversuche zur Histochemie dienten dazu, die beste Fixiertechnik und Färbemethode für die Hauptversuche zu finden.

4.2.1 Fixierung der Zellen

Nach der Fixierung der Zellen mit Methanol (100%), Ethanol (100%) und Formalin (4%) wurde darauf geachtet, ob die Monolayer in der späteren Färbe- und Nachweismethode abgeschwemmt wurden, ob die Probe, auf der die Zellen gewachsen sind, getrübt wurde und ob das Fixiermittel bei der Immunfluoreszenz selber fluoresziert. Die Ergebnisse sind zusammenfassend in Tabelle 4.2 dargestellt.

Dabei stellte sich heraus, dass Methanol (100%) die besten Resultate hinsichtlich dieser Gesichtspunkte lieferte. In den Hauptversuchen wurde daher nur noch dieses Fixiermittel eingesetzt.

Tabelle 4.2: Unterschiede von Methanol, Ethanol und Formalin als Fixiermittel

Fixiermittel	Abschwemmung	Trübung der Probe	Eigenfluoreszenz
Methanol (100%)	nein	nein	nein
Ethanol (100%)	nein	nein	ja
Formalin (4%)	nein	ja	nein

4.2.2 Berliner-Blau-Reaktion

Die in Kapitel 3.2.1 aufgezählten Partikel der Hersteller I-IV, die im Vorversuch verwendet wurden, konnten alle mit der Berliner-Blau-Färbung angefärbt werden. Die Partikel wurden intensiv blau, das Zytoplasma wurde leicht rosa und die einzelnen Zellkerne intensiv dunkelrot gefärbt.

4.2.3 Turnbulls-Reaktion

Bei der Turnbulls-Reaktion konnten sämtliche getestete Partikel (Kapitel 3.2.1) sichtbar gemacht werden. Das Zytoplasma stellte sich hellrosa, die Zellkerne rot und die Partikel dunkelbraun dar.

4.2.4 Quinckes-Reaktion

Bei diesem histochemischen Nachweis konnten nach der Färbung weder die Partikel noch die Zellen im Lichtmikroskop gesehen werden, da sich durch die Zugabe von Ammoniumsulfid-Lösung (10%) der Zellrasen von der Unterlage ablöste und so keine Zellen mehr auf dem Objektträgern haften blieben.

4.3 Immunhistochemie-Vorversuche

4.3.1 Direkte Immunhistochemie

Nachdem der Streptavidin-FITC-Antikörper auf die mit Partikeln P4, bzw. P5, inkubierten Zellen gegeben wurde (Kapitel 3.3.4.1), wurde die Probe mit „Dako Fluorescent Mounting Medium“ eingedeckt.

Bei der anschliessenden Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop (Leica DMR) bei einer Wellenlänge von 510nm, konnte weder eine Grünfluoreszenz der Partikel P4 noch der Partikel P5 beobachtet werden (siehe Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: In der direkten Immunhistochemie eingesetzte Partikel und deren Ergebnisse

Partikel	Grösse	Antikörper	Fluoreszenz der Partikel
P4 (Dextran-Biotin)	130nm	Streptavidin-FITC	nein
P5 (Dextran-Biotin)	250nm	Streptavidin-FITC	nein

4.3.2 Indirekte Immunhistochemie

Die indirekte Immunhistochemie wurde mit den Partikeln P2, P3, P6, P7 und P15 in der in Kapitel 3.3.4.2 beschriebenen Weise durchgeführt.

Nach der anschliessenden Einwirkung des sekundären Anti-Mouse-AK (siehe 3.3.4.2) auf die Präparate, die vorher schon mit dem primären AK besetzt wurden, wurden alle im Fluoreszenzmikroskop (Leica DMR) bei 510nm Wellenlänge betrachtet.

Das Ergebnis dieser Betrachtung ist in Tabelle 4.4 dargestellt. Bei Partikeln P6 und P7 war keine Fluoreszenz, bei Partikeln P2, P3 und P15 eine deutliche Grünfluoreszenz zu erkennen.

Tabelle 4.4: In der indirekten Immunhistochemie eingesetzte Partikel und deren Ergebnisse

Partikel	Grösse	Prim. Antikörper	Sek. Antikörper	Fluoreszenz der Partikel
P2 (Dextran-Avidin)	130nm	Anti-Avidin-Mouse-AK	Anti-Mouse-FITC	ja
P3 (Dextran-Avidin)	250nm	Anti-Avidin-Mouse-AK	Anti-Mouse-FITC	ja
P6 (Dextran-Streptavidin)	130nm	Biotin-Mouse-AK	Anti-Mouse-FITC	nein
P7 (Dextran-Streptavidin)	250nm	Biotin-Mouse-AK	Anti-Mouse-FITC	nein
P15 (Avidin)	10nm	Anti-Avidin-Mouse-AK	Anti-Mouse-FITC	ja

4.4 Histochemie-Hauptversuch

4.4.1 Berliner-Blau-Färbung

Die Ergebnisse der Auswertung der Berliner-Blau-Färbung nach einem semiquantitativen Score-System, wie es in Kap. 3.5. beschrieben wurde, sind in den Abbildungen 4.1- 4.15 dargestellt.

4.4.1.1 Methode

In dieser Färbemethode war zu erkennen, dass sich sämtliche Partikel mit dieser Methode blau anfärben liessen, wobei bei grösseren SPN die Färbung intensiver war als bei kleineren. Ausserdem war bei dieser Methode das Zytoplasma rosa und die Zellkerne rot gefärbt, so dass die Zellen und deren Vitalitätszustand gut beurteilbar waren. Desweiteren waren die blaue Farbe der Partikel und die Rottöne der Zellen komplementär zueinander, so dass es für das menschliche Auge im Lichtmikroskop einen guten Kontrast der Farben gab. Die Betrachtung der Zellen in Hinblick auf den Status „lebend“ oder „tot“ konnte anhand dieser Färbung ebenfalls durchgeführt werden. Die lebenden Zellen nahmen den Farbstoff an, während die toten Zellen blass blieben. Die Färbung war einfach und schnell, ohne Einsatz komplizierter technischer Mittel und ohne grossem finanziellen Aufwand durchführbar.

4.4.1.2 Zellreaktionen

Es war zu erkennen, dass sich SZ als die sensibelste von den drei eingesetzten Zellarten herausstellte. Der Zeitraum, bis die ersten Zellen bei toxischen Partikelsuspensionen abgestorben waren, stellte sich bei ihnen als der kürzeste heraus (Abb. 4.1 – 4.6). Ausserdem erfolgte die intrazelluläre Aufnahme von Partikeln am schnellsten, d.h. schon nach 12 Stunden waren sehr viele (ca. 60%) und nach 24 Stunden waren fast alle Partikel (ca. 90%) intrazytoplasmatisch aufzufinden (Abb. 4.7 – 4.9).

Die OB stellten das trägeste Reaktionssystem dar. Bei ihnen war die Partikelaufnahme nach 12 Stunden erst zu ca. 50% erfolgt, wobei allerdings das Maximum ebenfalls nach 24 Stunden erreicht wurde (Abb. 4.7 – 4.9).

Die CZ war die Zellart, die in der Reaktion zwischen den beiden anderen eingeordnet werden konnte. Es zeigte sich besonders deutlich in den Abb. 4.1 – 4.3 beim Anteil toter Zellen und bei der Zellform (Abb. 4.4 – 4.7), dass sie langsamer auf toxische Stoffe reagierten, indem die Absterberate geringer als bei den SZ, jedoch grösser als bei den OB war.

Die Partikelaufnahme der Zellen war bei allen drei Zellarten nur in das Zytoplasma zu beobachten, was sich darin äusserte, dass die Zellkerne bei fast sämtlichen Präparaten frei von Partikeln blieben (Abb. 4.10 – 4.15) und damit keine blauen Punkte unter dem Mikroskop aufwiesen.

4.4.1.3 Partikeleigenschaften

Partikel 3 zeigte im Vergleich zu den anderen zwei Partikeln eine sehr schnelle und gute Aufnahme in die Zellen (nach 12 Stunden schon fast vollständig aufgenommen) (Abb. 4.8). Ausserdem lag die Absterberate der verschiedenen Zellen auf einem sehr niedrigen -Niveau was sich in der Zellform (Abb. 4.5) und im Anteil toter Zellen (Abb. 4.2) widerspiegelte. Desweiteren lagen bei dieser Art von SPN die Partikel von Beginn der Untersuchung an kaum aggregiert vor.

P2 zeigte im Vergleich zu P3 ebenfalls schnelle und sehr gute Absorptionseigenschaften (Abb. 4.7). Allerdings war die Aggregation der einzelnen Partikel verglichen mit den anderen am höchsten, was sich jedoch durch eine höhere Verdünnungsstufe (0,625mg/ml) der Suspension etwas einschränken liess (siehe Abb. 4.1, 4.2, 4.4 und 4.5). Der Anteil der toten Zellen und Veränderung der Zellform (Abb. 4.1 und 4.4), die durchaus miteinander korrelierten und die Toxizität der SPN veranschaulichten, lagen bei P 2 und P 3 sehr eng beieinander und relativ tief.

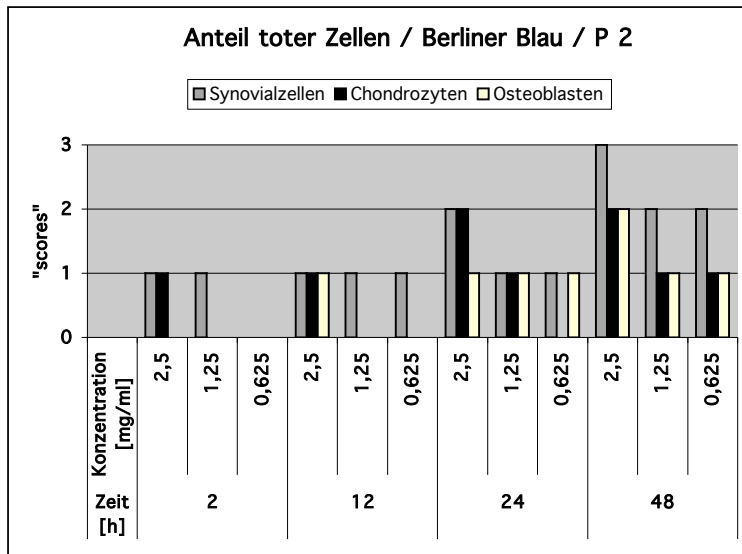
Aus dem Versuch mit P15 ergaben sich die schlechtesten Ergebnisse. Bereits bei sehr geringen Konzentrationen von 0,625mg/ml und Einwirkzeiten von 2 Stunden war praktisch der ganze Zellrasen zerstört und die Zellen abgetötet (Abb. 4.3, 4.6 und 4.9), was die Aufnahme der Partikel grösstenteils verhinderte. Die Partikel hingen nur noch mechanisch an der zerstörten Zellmembran, was lichtmikroskopisch zu Verwechslungen mit der intrazytoplasmatischen Aufnahme führen konnte.

4.4.1.4 Konzentrationen

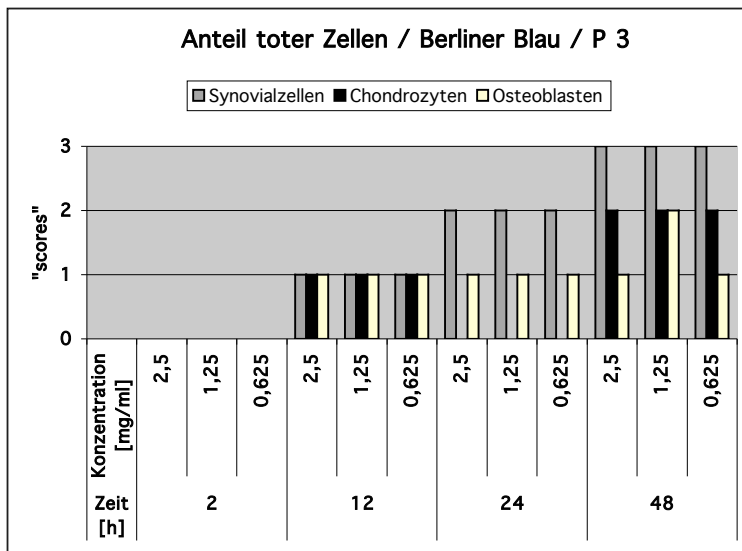
Beim Vergleich der Konzentrationen zwischen 0,625 und 2,5mg/ml konnte festgestellt werden, dass es bei geringen Partikelkonzentrationen zu geringeren Absterberaten der Zellen kam und die Gefahr der Aggregation der einzelnen Partikel verringert wurde.

4.4.1.5 Inkubationszeiten

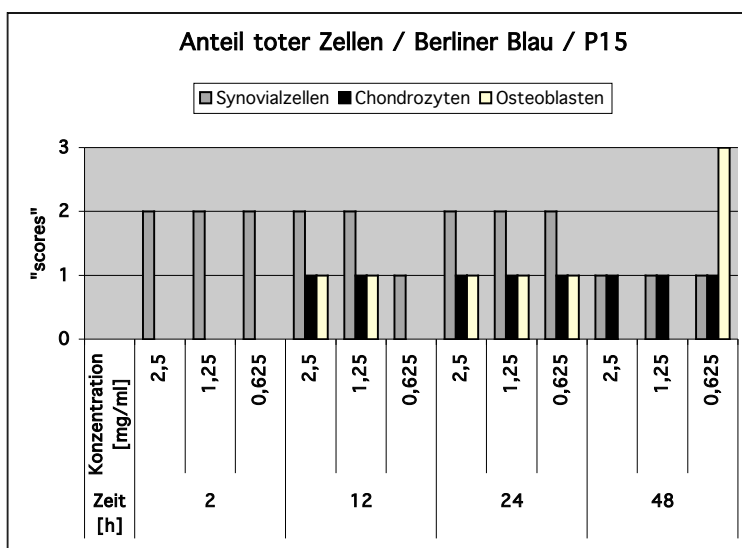
Die verschiedenen Zeitintervalle der Inkubation der Zellen mit Partikeln zwischen 2 und 48 Stunden zeigten, dass die Zellen bei längeren Inkubationszeiten als 24 Stunden immer mehr in Mitleidenschaft gezogen wurden, d.h. dass die Absterberate beträchtlich stieg (Abb. 4.1 – 4.6).

**Abb. 4.1:**

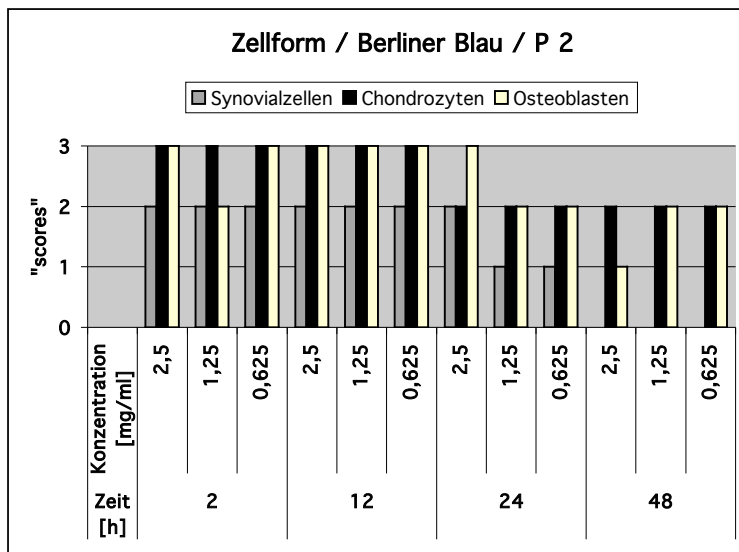
Auswertung der Berliner-Blau-Färbung von Partikel P2 im Hinblick auf den Anteil toter Zellen

**Abb. 4.2:**

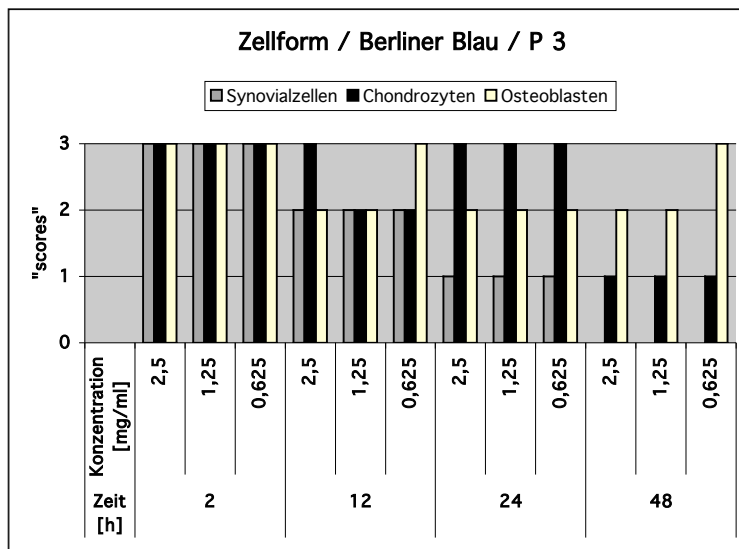
Auswertung der Berliner-Blau-Färbung von Partikel P3 im Hinblick auf den Anteil toter Zellen

**Abb. 4.3:**

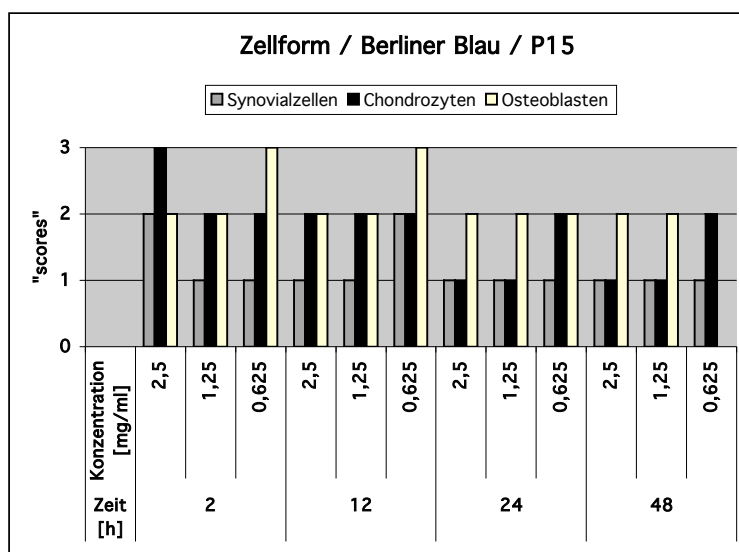
Auswertung der Berliner-Blau-Färbung von Partikel P15 im Hinblick auf den Anteil toter Zellen

**Abb. 4.4:**

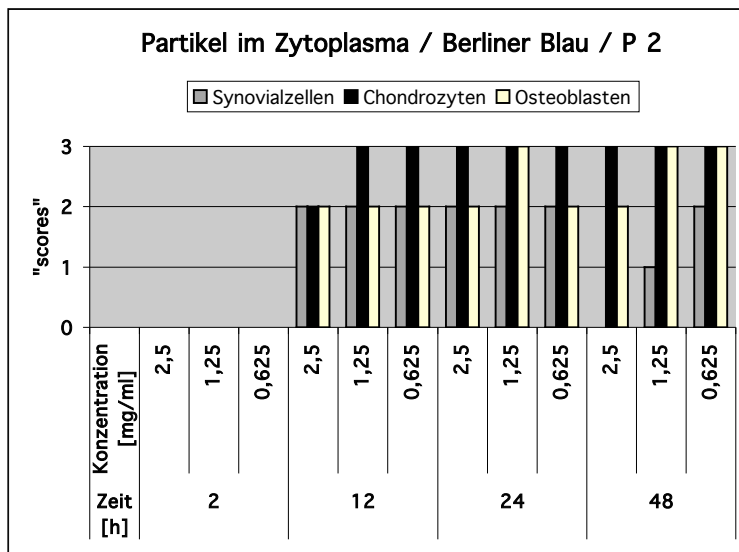
Auswertung der Berliner-Blau-Färbung von Partikel P2 im Hinblick auf die Veränderung der Zellform

**Abb. 4.5:**

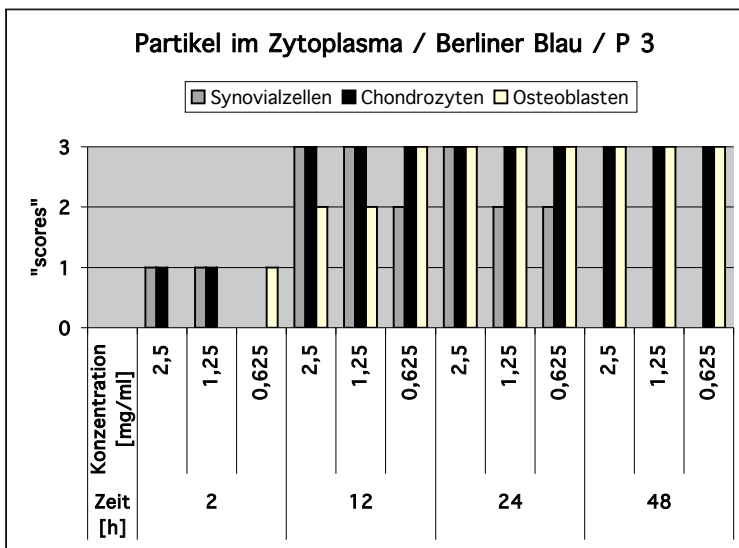
Auswertung der Berliner-Blau-Färbung von Partikel P3 im Hinblick auf die Veränderung der Zellform

**Abb. 4.6:**

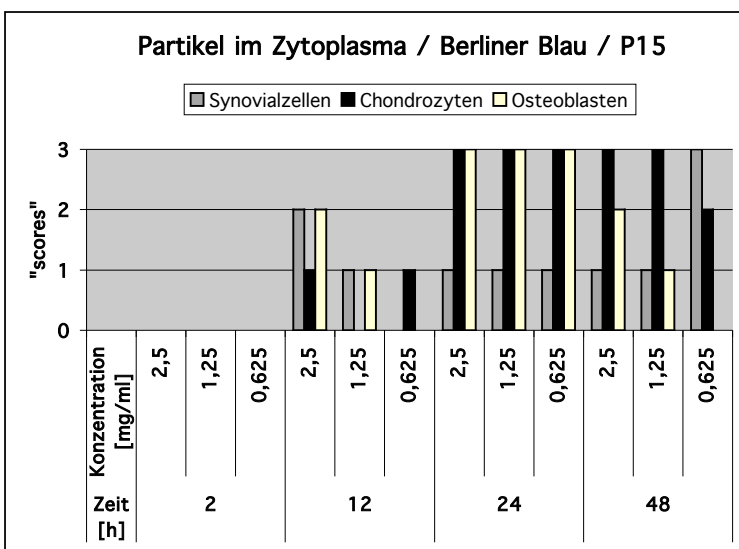
Auswertung der Berliner-Blau-Färbung von Partikel P15 im Hinblick auf die Veränderung der Zellform

**Abb. 4.7:**

Auswertung der Berliner-Blau-Färbung von Partikel P2 im Hinblick auf intrazelluläre Aufnahme

**Abb. 4.8:**

Auswertung der Berliner-Blau-Färbung von Partikel P3 im Hinblick auf intrazelluläre Aufnahme

**Abb. 4.9:**

Auswertung der Berliner-Blau-Färbung von Partikel P15 im Hinblick auf intrazelluläre Aufnahme

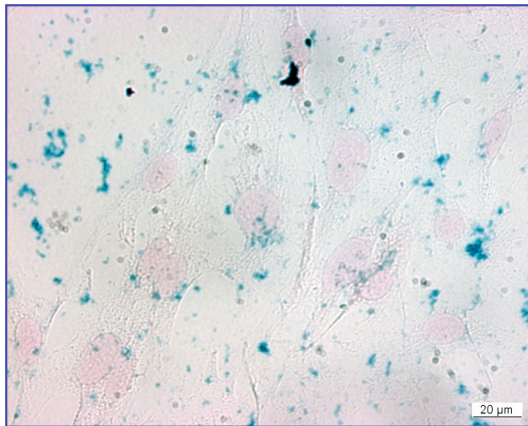


Abb. 4.10:

*Berliner-Blau-Färbung von SZ mit
Partikel 3 nach 2 Stunden Inkubation*

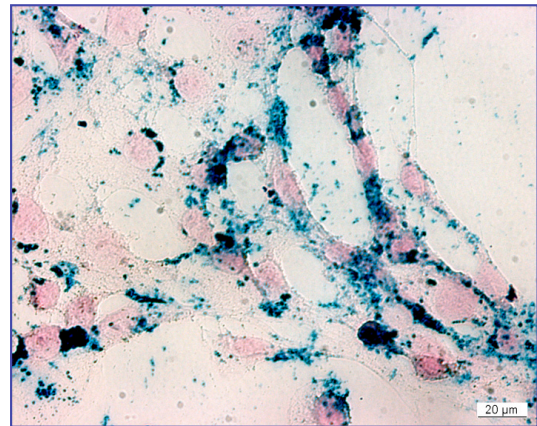


Abb. 4.11:

*Berliner-Blau-Färbung von SZ mit
Partikel 3 nach 48 Stunden Inkubation*

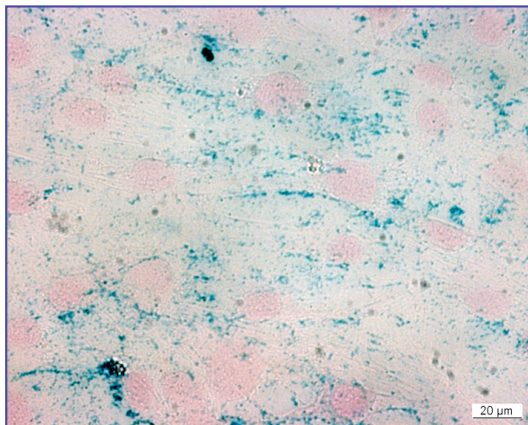


Abb. 4.12:

*Berliner-Blau-Färbung von CZ mit
Partikel 2 nach 2 Stunden Inkubation*

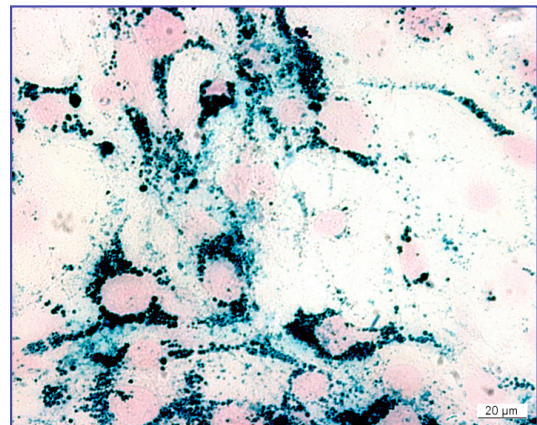


Abb. 4.13:

*Berliner-Blau-Färbung von CZ mit
Partikel 2 nach 48 Stunden Inkubation*

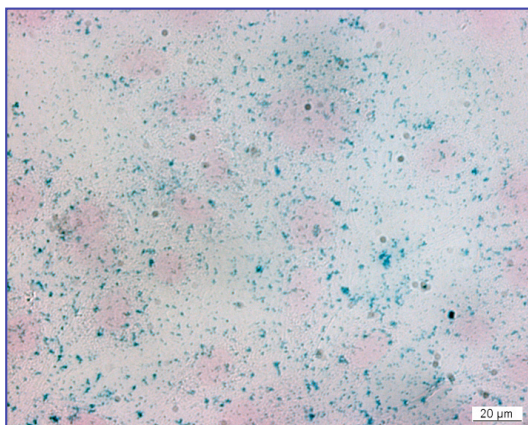


Abb. 4.14:

*Berliner-Blau-Färbung von OB mit
Partikel 3 nach 2 Stunden Inkubation*

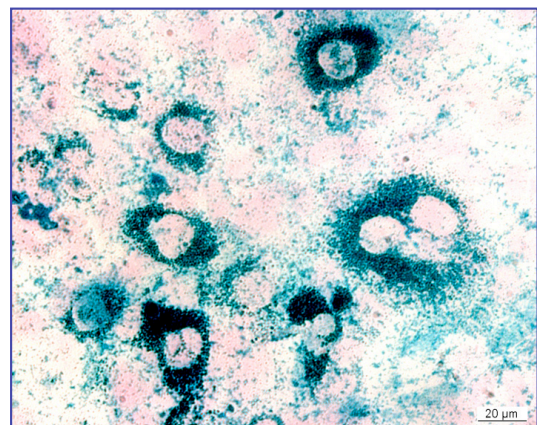


Abb. 4.15:

*Berliner-Blau-Färbung von OB mit
Partikel 3 nach 48 Stunden Inkubation*

4.4.2 Turnbulls-Reaktion

4.4.2.1 Methode

Die Durchführung der Turnbulls-Färbung entsprach vom technischen, finanziellen und zeitlichen Aufwand her gesehen, fast der Berliner-Blau-Färbung. Die Sichtbarkeit der Partikel stellte sich allerdings im Vergleich schwächer dar. Die SPN waren braun, die Zellkerne rot und das Zytoplasma rosa gefärbt (Abb. 4.25 – 4.30). Da Braun und Rot keine Komplementärfarben sind, war der Kontrast zwischen Partikel und Umgebung im Lichtmikroskop geringer.

Durch die Rotfärbung von Zellkern und Zytoplasma liess sich der Zustand der Zellen gut beurteilen.

4.4.2.2 Zellreaktionen

Die Beurteilung der Reaktion der verschiedenen Partikel auf die verschiedenen Zellarten liess sich schwieriger als bei der Berliner-Blau-Reaktion beurteilen. Allerdings ergab die Auswertung bei dieser Färbung die gleichen Ergebnisse hinsichtlich der Reaktion der Partikel auf die Zellen, wie in Kapitel 4.4.1.2 beschrieben und den Abb. 4.16 – 4.24 zu entnehmen ist.

4.4.2.3 Partikeleigenschaften

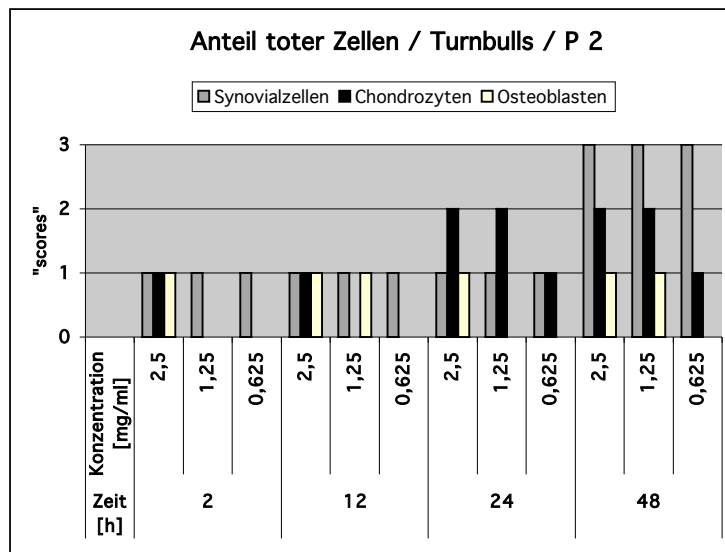
Die Eigenschaften, die die drei verschiedenen SPN aufweisen und die bei der Reaktion mit den drei Zellarten zum Vorschein kamen, wurden bereits bei der Berliner-Blau-Färbung beschrieben (siehe Kapitel 4.4.1.3 und Abb. 4.16 – 4.24) und liessen sich mit dieser histochemischen Methode bestätigen.

4.4.2.4 Konzentrationen

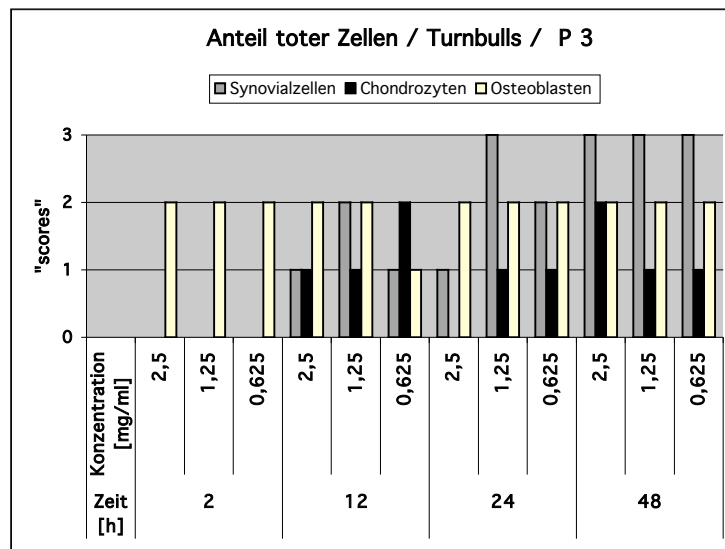
Bei den drei eingesetzten Konzentrationen der Partikelsuspensionen von 0,625, 1,5 und 2,5mg/ml verursachte die geringste Konzentration den geringsten negativen Einfluss auf die Zellen (Abb. 4.16 – 4.21) und die geringste Agglomeration, was auch schon bei der Berliner-Blau-Färbung (Kapitel 4.4.1.4) festzustellen war.

4.4.2.5 Inkubationszeiten

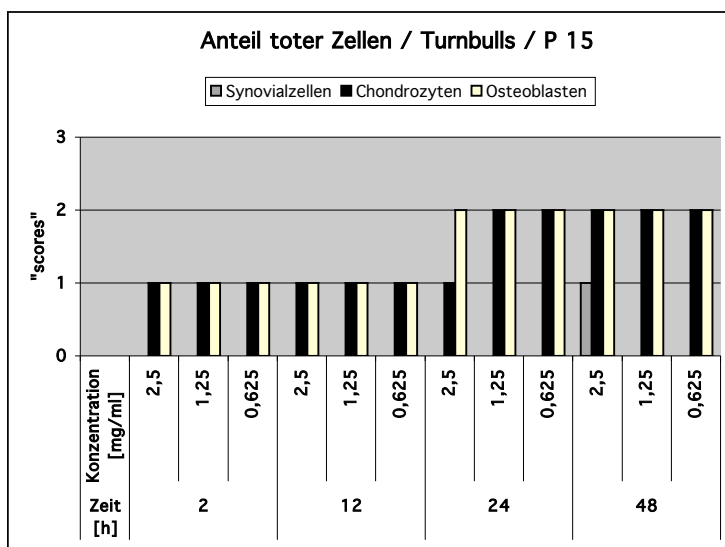
Bezüglich der Inkubationszeiten kann das Ergebnis der Berliner-Blau-Färbung (Kapitel 4.4.1.5) bestätigt werden.

**Abb. 4.16:**

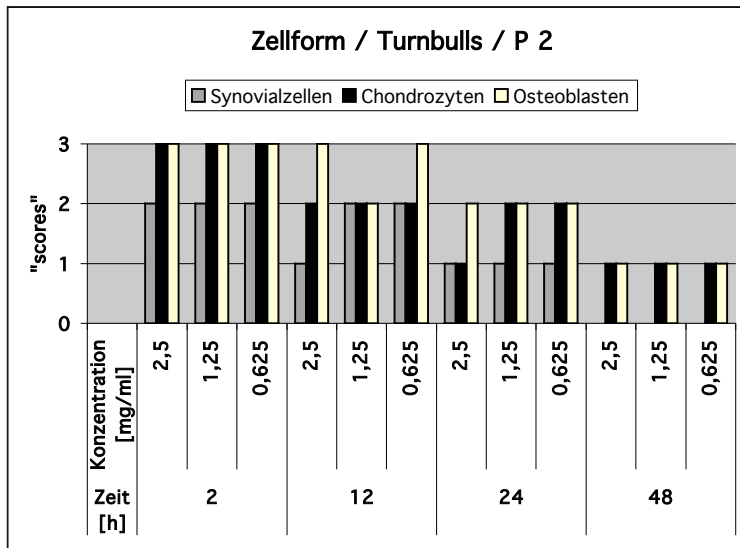
Auswertung der Turnbulls-Färbung von Partikel 2 im Hinblick auf den Anteil toter Zellen

**Abb. 4.17:**

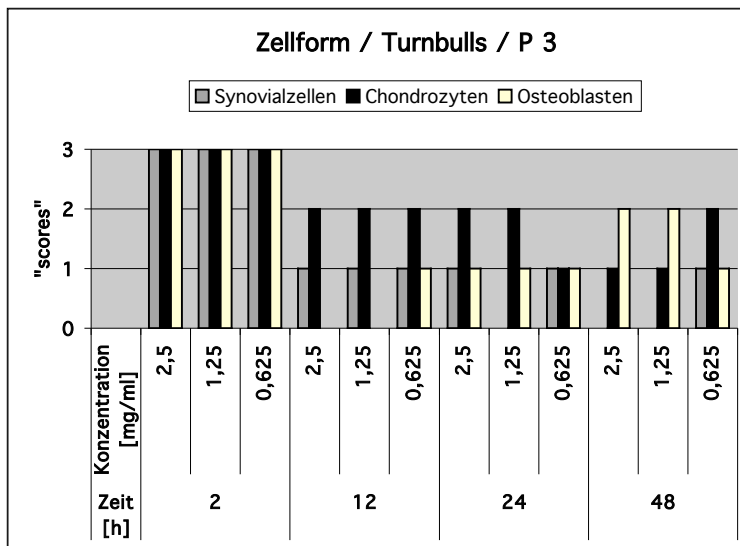
Auswertung der Turnbulls-Färbung von Partikel 3 im Hinblick auf den Anteil toter Zellen

**Abb. 4.18:**

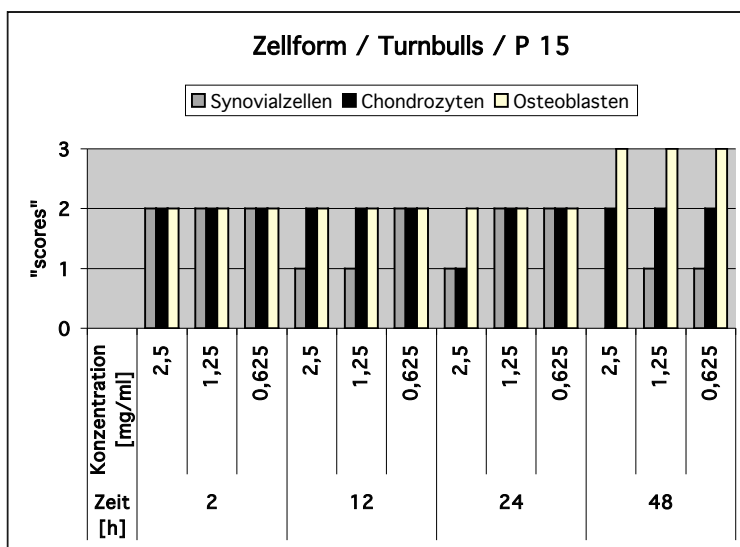
Auswertung der Turnbulls-Färbung von Partikel 15 im Hinblick auf den Anteil toter Zellen

**Abb. 4.19:**

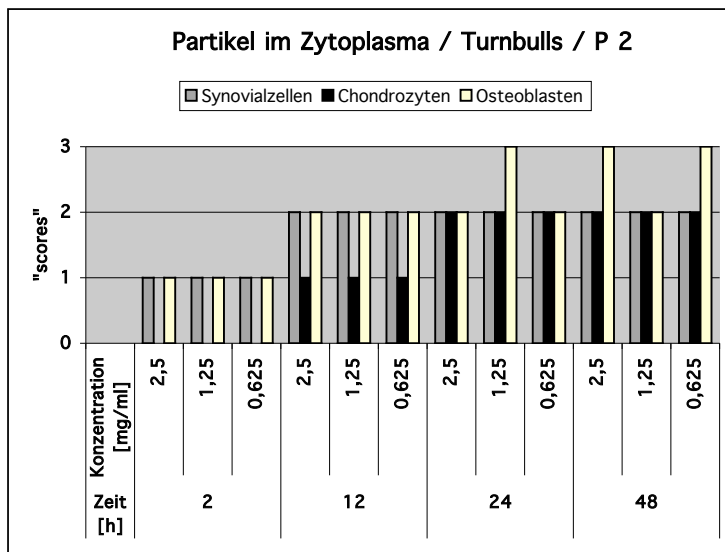
Auswertung der Turnbulls-Färbung von Partikel 2 im Hinblick auf die Veränderung der Zellform

**Abb. 4.20:**

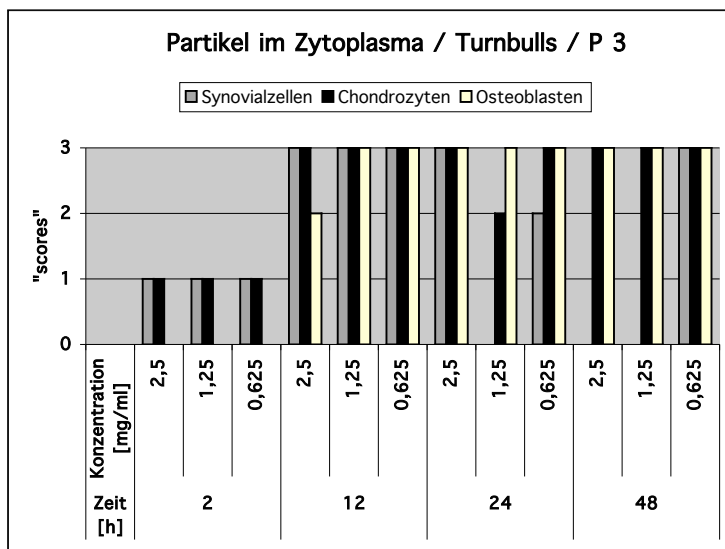
Auswertung der Turnbulls-Färbung von Partikel 3 im Hinblick auf die Veränderung der Zellform

**Abb. 4.21:**

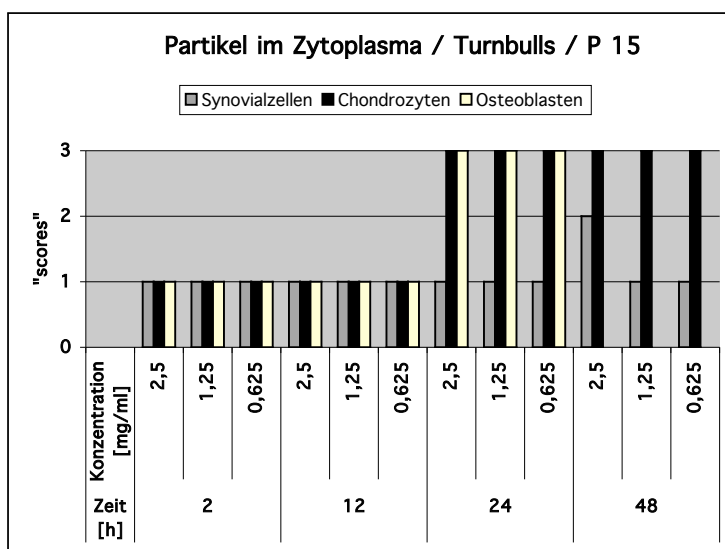
Auswertung der Turnbulls-Färbung von Partikel 15 im Hinblick auf die Veränderung der Zellform

**Abb. 4.22:**

Auswertung der Turnbulls-Färbung von Partikel 2 im Hinblick auf intrazelluläre Aufnahme

**Abb. 4.23:**

Auswertung der Turnbulls-Färbung von Partikel 3 im Hinblick auf intrazelluläre Aufnahme

**Abb. 4.24:**

Auswertung der Turnbulls-Färbung von Partikel 15 im Hinblick auf intrazelluläre Aufnahme

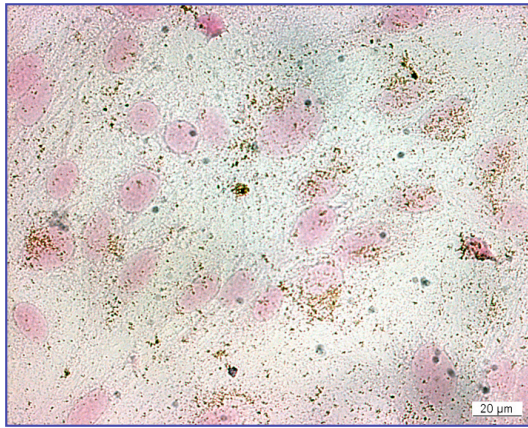


Abb. 4.25:

Turnbolls-Färbung von SZ mit Partikel 3 nach 2 Stunden Inkubation

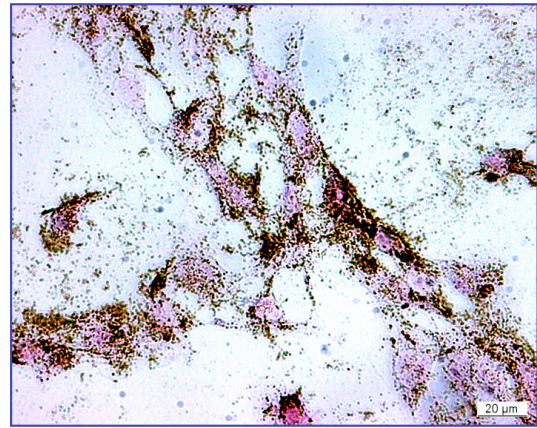


Abb. 4.26:

Turnbolls-Färbung von SZ mit Partikel 3 nach 48 Stunden Inkubation

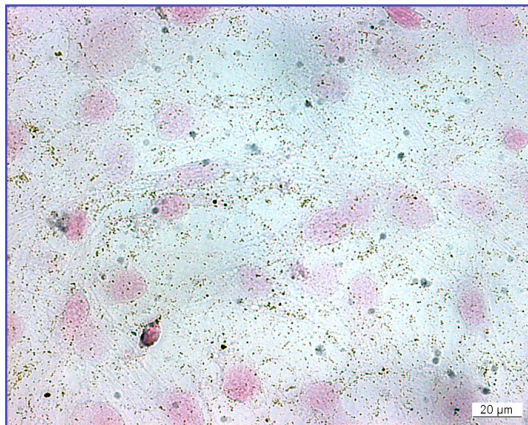


Abb. 4.27:

Turnbolls-Färbung von CZ mit Partikel 2 nach 2 Stunden Inkubation

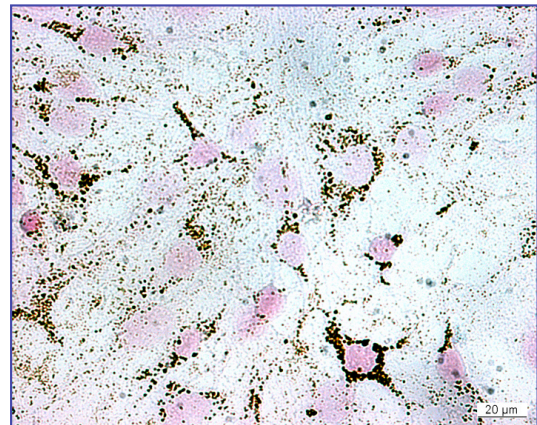


Abb. 4.28:

Turnbolls-Färbung von CZ mit Partikel 2 nach 48 Stunden Inkubation

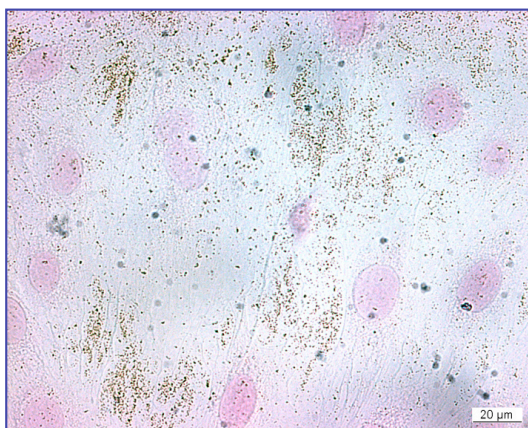


Abb. 4.29:

Turnbolls-Färbung von OB mit Partikel 3 nach 2 Stunden Inkubation

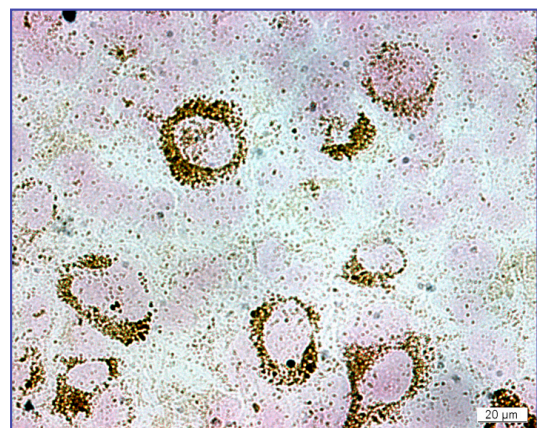


Abb. 4.30:

Turnbolls-Färbung von OB mit Partikel 3 nach 48 Stunden Inkubation

4.4.3 Quinckes-Reaktion

Da die Durchführung dieser Färbung und vor allem die anschliessende Auswertung nicht möglich war wurde im Hauptversuch die Quinckes-Reaktion nicht mehr eingesetzt.

4.5 Immunhistochemie

4.5.1 Direkte Immunhistochemie

Die direkte Immunhistochemie wurde wegen der negativen Ergebnisse der Vorversuche, d.h. wegen der nicht möglichen Sichtbarmachung unter dem Fluoreszenzmikroskop, im Hauptversuch nicht mehr durchgeführt.

4.5.2 Indirekte Immunhistochemie

4.5.2.1 Methode

Die Sichtbarmachung der Avidin-SPN unter dem Fluoreszenzmikroskop war mit dem primären Antikörper (Anti-Avidin-Mouse-AK) und dem sekundären FITC gekoppelten Anti-Mouse-AK teilweise möglich. Das bedeutet, dass die Methode bei einem Prozentsatz von ca. 20% zur Grünfluoreszenz der SPN führte. Durch die Anordnung des Fluoreszenzfarbstoffes unter dem Mikroskop in der Probe liessen sich auch Strukturen wie Zellkern und Zellmembran erahnen, bzw. indirekt erkennen.

Bei diesen 20% war auch eine Auswertung der Proben möglich, wobei bei den restlichen 80% keine Partikel im Fluoreszenzmikroskop zu sehen waren.

Aus diesem Grund war es nicht möglich die Auswertung der Proben vollständig nach dem semiquantitativen „Score“-System zu machen, da viele Punktwerte in den Tabellen fehlten, bzw. mit dem Wert 0 besetzt waren.

Es wurde versucht die Auswertung anhand der wenigen positiv (20%) eingefärbten Proben durchzuführen. Eine Auswahl der Ergebnisse dieser Färbemethode wurde in den Abbildungen 4.31 – 4.36 dargestellt.

4.5.2.2 Zellreaktionen

Die Reaktion der Zellen liess sich mit dieser Färbemethode im Prinzip in ähnlicher Weise wie in Kapitel 4.4.1 und 4.4.2 beschreiben. Die SZ zeigten die höchste Absterberate vor allem

nach 48h, was sich in einer nicht konkret zuzuordnenden Fluoreszenzfarbstoffverteilung darstellte. Diese multifokale Verteilung war bei Inkubationszeiten von 12h und 24h nicht in dem hohen Masse zu sehen.

Nach 24h war eine Anordnung des Fluoreszenzfarbstoffes jeweils um einen nicht angefärbten ovalen Kreis, der vermutlich den Zellkern darstellte, zu erkennen.

Bei den CZ war das Bild ähnlich dem der SZ, mit dem Unterschied, dass der Farbstoff nach 48h nicht so stark ungeordnet und verstreut vorlag, was auf eine geringere Absterberate schliessen lassen konnte.

Bei den OB war die Absterberate am geringsten, aber die Zeit bis zur Partikelaufnahme, im Vergleich zu den anderen Zellen, verhältnismässig lang (24 - 48h) war.

4.5.2.3 Partikeleigenschaften

Zwischen Partikel 2 und 3 war bei dieser Methode kein sichtbarer Unterschied zu bemerken, d.h. beide Partikel zeigten bei den gleichen Zellarten zur gleichen Zeit das gleiche Bild.

Partikel 15 zeigte im Gegensatz dazu eine beachtlich geringere Intensität der Fluoreszenz, was die Auswertung dieser Proben nahezu unmöglich machte.

Vor allem bei den SZ war zu erkennen, dass die P15 im Vergleich zu P2 und P3 kein geordnetes Farbbild aufwiesen, was auf eine höhere Toxizität der P15 hindeutete.

4.5.2.4 Konzentrationen

Beim Vergleich der drei verschiedenen Konzentrationen (0,625, 1,25 und 2,5mg/ml) wurde kein Unterschied im fluoreszenzmikroskopischen Bild, weder im Hinblick auf die Farbintensität, noch auf die Absterberate festgestellt.

4.5.2.5 Inkubationszeiten

Die SZ zeigten nach 12h die schnellste Partikelaufnahme in die Zellen, da nach dieser Zeit schon viel Fluoreszenzfarbe, teilweise angeordnet, zu sehen war. Nach 2h wurde im Vergleich dazu wenig Fluoreszenz beobachtet, die vor allem auch ungeordnet vorlag.

Nach 24h sah man die grösste und am meisten geordnete Fluoreszenz im Bild, d.h. es erschienen grüne etwas gefranste Bereiche mit dunklem ovalen Zentrum.

Nach 48h waren bei den Synovialzellen diese verschwunden und der Farbstoff lag fast vollständig multifokal verstreut vor.

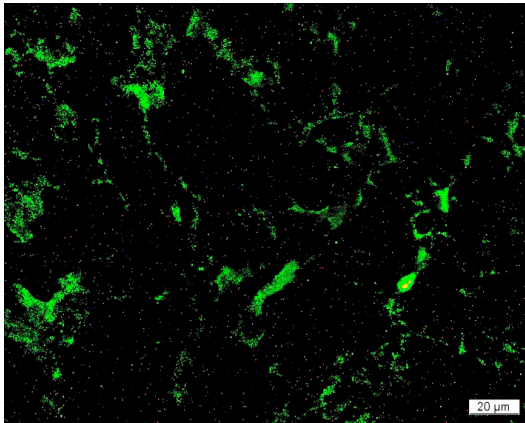


Abb. 4.31:

*Fluoreszenzmikroskopie von SZ mit
Partikel 3 nach 2 Stunden Inkubation*

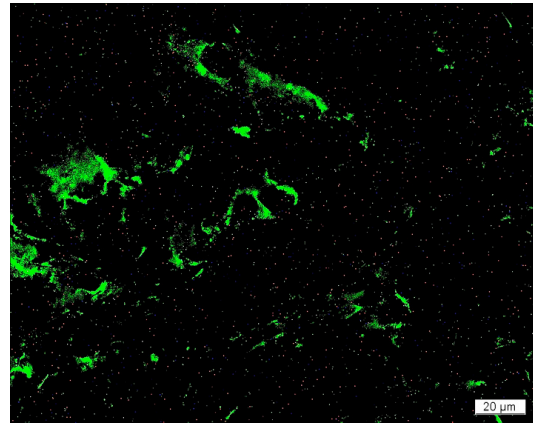


Abb. 4.32:

*Fluoreszenzmikroskopie von SZ mit
Partikel 3 nach 48 Stunden Inkubation*

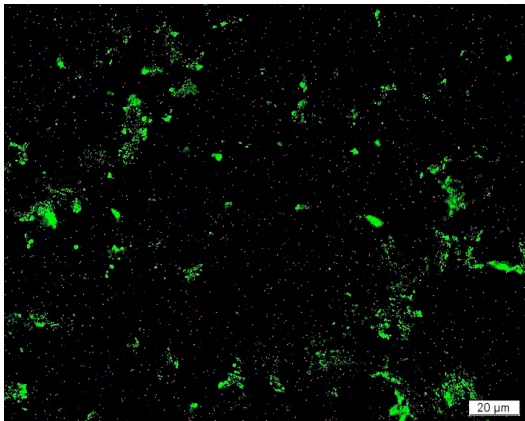


Abb. 4.33:

*Fluoreszenzmikroskopie von CZ mit
Partikel 2 nach 2 Stunden Inkubation*

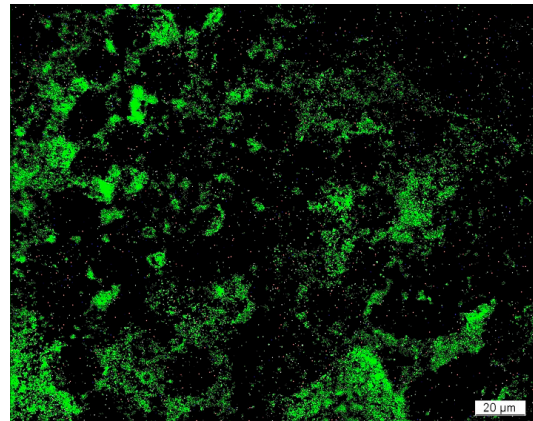


Abb. 4.34:

*Fluoreszenzmikroskopie von CZ mit
Partikel 2 nach 48 Stunden Inkubation*

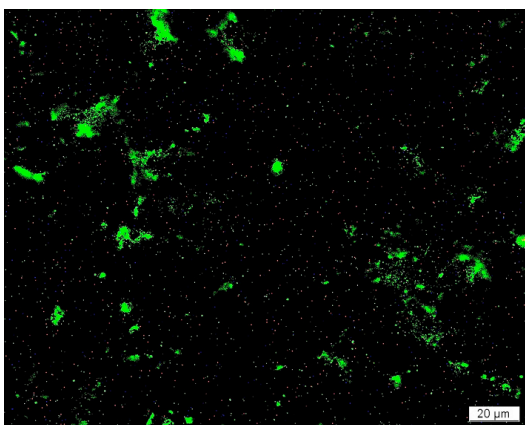


Abb. 4.35:

*Fluoreszenzmikroskopie von OB mit
Partikel 3 nach 2 Stunden Inkubation*

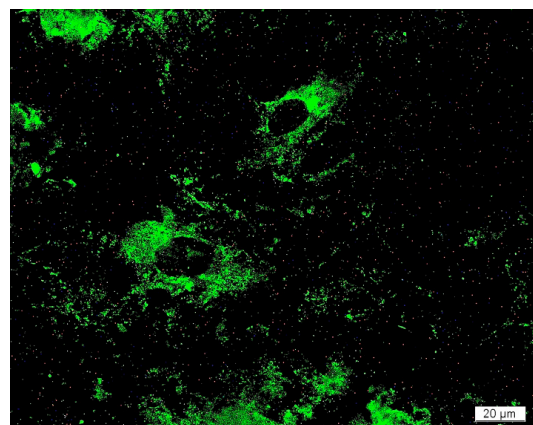


Abb. 4.36:

*Fluoreszenzmikroskopie von OB mit
Partikel 3 nach 48 Stunden Inkubation*

4.6 Physikalische Methoden

4.6.1 TEM

4.6.1.1 Methode

Die Transmissions Elektronen Mikroskopie (TEM) war die Methode zur Erkennung der SPN, bei der die Partikel einzeln und die Zellstrukturen und Zellorganellen am genauesten beurteilt werden konnten (siehe Abb. 4.37 – 4.42).

Die Partikel stellten sich deutlich als schwarze Pünktchen zwischen den grauen Strukturen der Zellen dar.

Der Arbeits- und der Kostenaufwand zur Erstellung der Proben und der Bilder, lagen bei der TEM, im Vergleich zu den anderen Methoden, am höchsten.

4.6.1.2 Zellreaktionen

Wie schon bei den histologischen Färbetechniken vermutet und beschrieben, zeigten alle Zellen eine Aufnahme der verschiedenen SPN in das Zytoplasma. Bereits nach 2h wurde bei den SZ ein Grossteil der Partikel aufgenommen. Da die Proben nur 2h und 48h inkubiert wurden, konnte keine Beurteilung nach 12h und 24h erfolgen. Nach 48h zeigten alle Zellarten eine hohe Anzahl an aufgenommenen SPN im Zytoplasma.

Der Zellkern war in allen Präparaten nicht mit Partikeln bedeckt, so dass man von keiner Aufnahme der getesteten Partikel in den Nukleus ausgehen konnte.

Bei den CZ und OB waren keine gravierenden Unterschiede im Zellverhalten zu erkennen. Die Absterberate lag bei den SZ im Vergleich zu den anderen am höchsten, was auf eine höhere Empfindlichkeit dieser Zellart bestätigte. Ergänzend ist zu erwähnen, dass in den Präparaten der SZ und der CZ Mykoplasmen im TEM zu erkennen waren, was eine mögliche, leichte Beeinträchtigung des Zellverhaltens hervorgerufen haben könnte.

4.6.1.3 Partikeleigenschaften

Bei der Auswertung des Zellverhaltens als Reaktion auf die drei Partikelarten verursachte P15 nach 48h die höchste Anzahl abgestorbener Zellen und konnte somit als der toxischste Partikel bezeichnet werden.

P2 zeigte im Vergleich zu P3 und P15 einen höheren Anteil an aggregierten Partikeln ausserhalb der Zellen.

P15 war durch seine geringe Grösse am schlechtesten im TEM-Bild von anderen Strukturen, wie Verunreinigungen oder ähnlichem zu differenzieren.

4.6.1.4 Konzentrationen

Da nur eine Konzentration von 1,25mg/ml für die TEM-Auswertung verwendet wurde, konnte keine Aussage über das Verhalten der Zellen und der Partikel in unterschiedlichen Konzentrationen gemacht werden.

4.6.1.5 Inkubationszeiten

Beim Vergleich der zwei Zeiten von 2h und 48h konnte festgestellt werden, dass nach 2h eine kleine Anzahl von Partikeln ins Zytoplasma aller Zellen aufgenommen worden war, wobei die SZ die grösste aufgenommene Menge vorwies (siehe Abb. 4.37, 4.39 und 4.41).

Nach 48h war die intrazytoplasmatische Partikelanzahl bei allen drei Zellarten annähernd gleich (Abb. 4.38, 4.40 und 4.42).

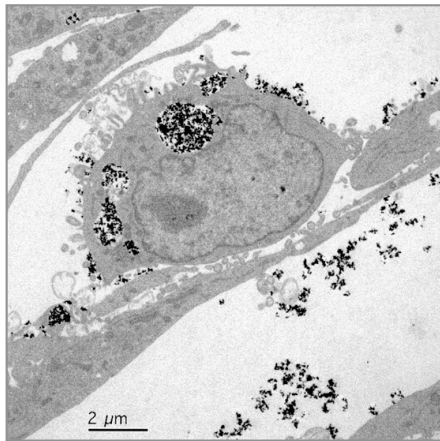


Abb. 4.37:

*TEM von SZ mit Partikel 3
nach 2 Stunden Inkubation*

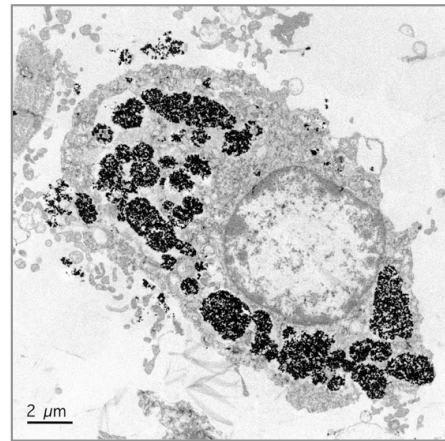


Abb. 4.38:

*TEM von SZ mit Partikel 3
nach 48 Stunden Inkubation*

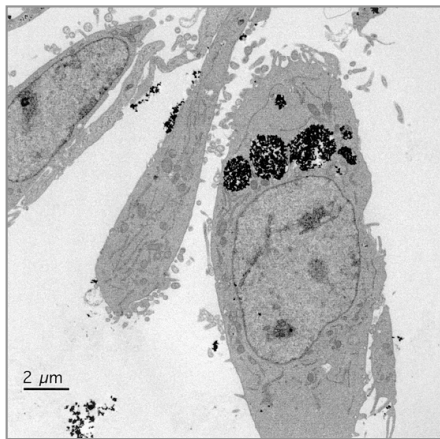


Abb. 4.39:

*TEM von CZ mit Partikel 2
nach 2 Stunden Inkubation*

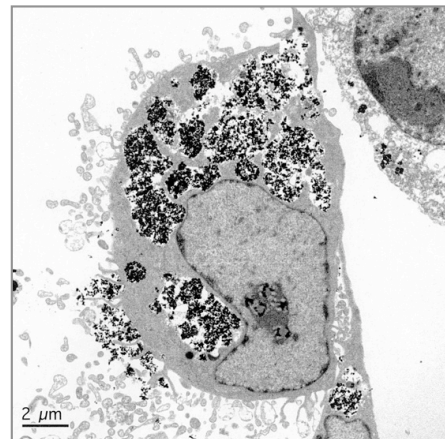


Abb. 4.40:

*TEM von CZ mit Partikel 2
nach 48 Stunden Inkubation*

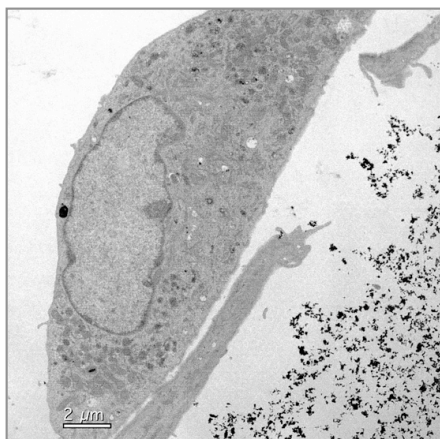


Abb. 4.41:

*TEM von OB mit Partikel 3
nach 2 Stunden Inkubation*

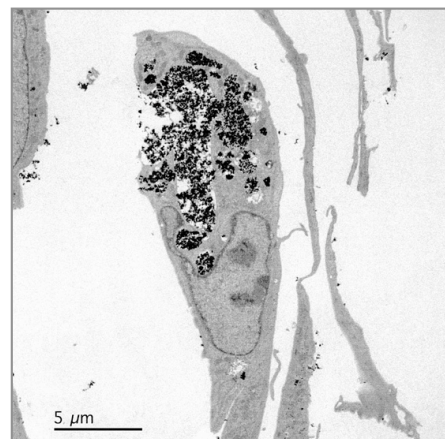


Abb. 4.42:

*TEM von OB mit Partikel 3
nach 48 Stunden Inkubation*

4.6.2 Mapping Local Susceptibility

4.6.2.1 Methode

Um magnetische Eigenschaften von SPN zu messen und sichtbar zu machen, konnte das Local Susceptibility-Messgerät eingesetzt werden. Es zeigte sich nach der Messung, dass bei allen Partikeln keine Werte der magnetischen Feldstärke höher als $1,5 \times 10^{-4}$ aufgetreten sind, was sich als Gelbton in den Abb. 4.43 – 4.48 darstellte. Die Auflösung dieser Methode war relativ klein, so dass nur ein Sichtfeld von ca. 1cm^2 zu beobachten war und somit nur eine sehr grobe Verteilung der SPN in der Probe sichtbar gemacht werden konnte.

4.6.2.2 Zellreaktionen

Die Reaktionen der Zellen auf die verschiedenen Partikel konnten nicht dargestellt werden, da die Auflösung zu klein war, um zu beurteilen, wo sich die Partikel im Umfeld der Zellen befinden. Ausserdem wurden nur die Partikel sichtbar, nicht aber Zellmembran oder Zellkern, was die Beurteilung der Aufnahme der SPN in die Zellen und den Zustand hinsichtlich „lebend“ oder „tot“ unmöglich machte.

Wenn die sichtbaren Partikel als aufgenommene Partikel bezeichnet worden wären, wäre es möglich zu behaupten, dass die SZ am schnellsten (nach 2h) und in höchstem Masse die verschiedenen Partikel aufnahmen. Ähnlich verhielten sich CZ, wobei die Aufnahme erst zu einem späteren Zeitpunkt (zwischen 2h und 48h) stattfand. Bei den OB war mit dieser Methode keine Aufnahme der SPN in die Zellen zu erkennen.

4.6.2.3 Partikeleigenschaften

Es war mit dieser Methode unmöglich festzustellen, ob die 3 Partikel aggregiert waren oder nicht. Ausserdem konnte auch anhand dieser Methode keine Aussage über die Toxizität der Partikel gemacht werden.

Allerdings war mit dieser Methode feststellbar, dass von SZ P3 im Vergleich zu P2 in höherer Menge aufgenommen wurde.

Bei den Proben mit den CZ konnte man eine vermehrte Ansammlung von P2 nach 48h erkennen. P3 zeigte eine geringere Konzentration der SPN in der Probe.

Bei den OB konnten, wie schon in Absatz 4.6.2.2 erwähnt, keine Partikel in den Proben sichtbar gemacht werden.

Partikel 15 konnte in diesem Nachweis nicht beurteilt werden.

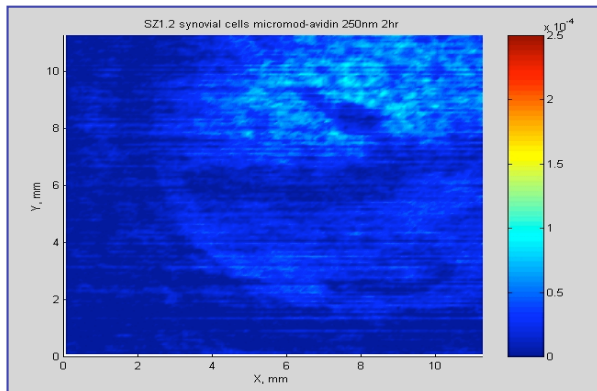
4.6.2.4 Konzentrationen

Da bei den Proben nur Partikelkonzentrationen von 2,5mg/ml eingesetzt wurden, konnte keine Aussage über die Reaktion der Zellen auf verschiedene Konzentrationen gemacht werden.

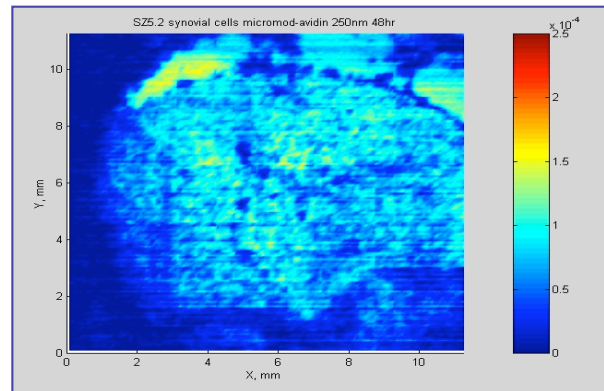
4.6.2.5 Inkubationszeiten

Wie schon in Absatz 4.6.2.3 und 4.6.2.4 erwähnt, waren nach 2h nur bei den SZ eine grosse Anzahl an SPN ins Zytoplasma eingeschlossen, wobei P3 noch schneller aufgenommen wurde als P2. Nach 48h waren sowohl bei den CZ als auch bei den SZ grosse Mengen an SPN sichtbar, wobei bei den SZ die P3 und bei CZ die P2 überwiegen.

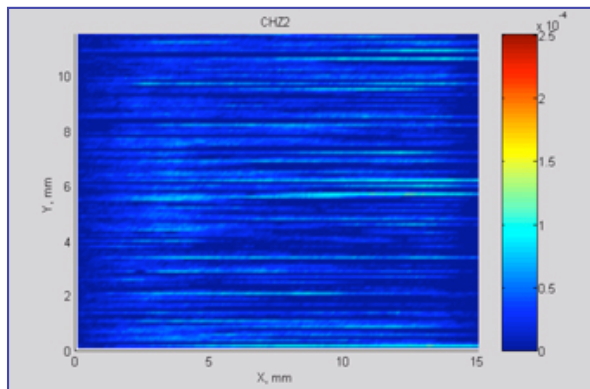
Bei den OB konnte kein Unterschied zwischen den zwei Zeiten festgestellt werden, da keine Partikel zu erkennen waren.

**Abb. 4.43:**

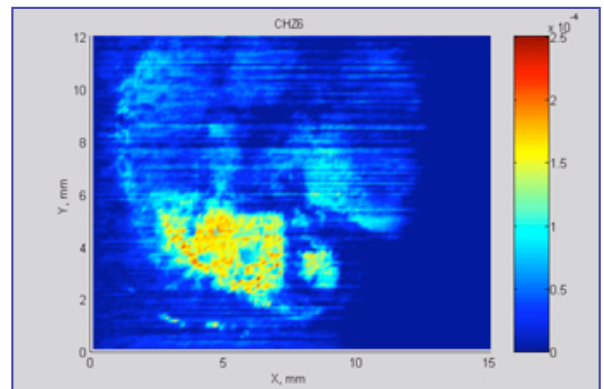
Mapping local susceptibility von SZ mit Partikel 3 nach 2 Stunden Inkubation

**Abb. 4.44:**

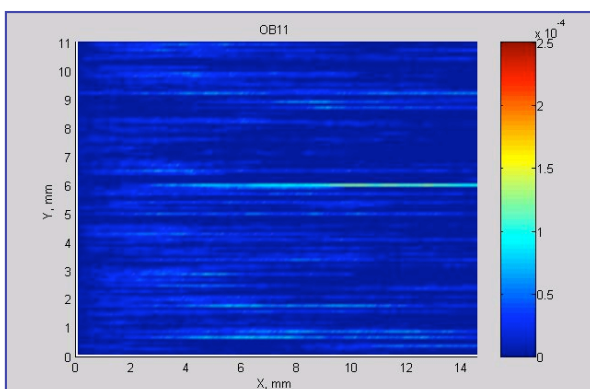
Mapping local susceptibility von SZ mit Partikel 3 nach 48 Stunden Inkubation

**Abb. 4.45:**

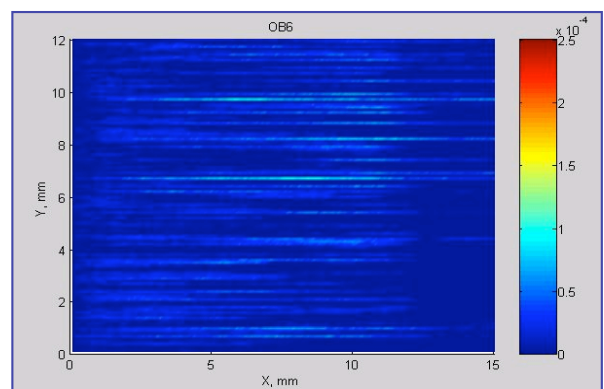
Mapping local susceptibility von CZ mit Partikel 3 nach 2 Stunden Inkubation

**Abb. 4.46:**

Mapping local susceptibility von CZ mit Partikel 3 nach 48 Stunden Inkubation

**Abb. 4.47:**

Mapping local susceptibility von OB mit Partikel 3 nach 2 Stunden Inkubation

**Abb. 4.48:**

Mapping local susceptibility von OB mit Partikel 3 nach 48 Stunden Inkubation

5 Diskussion

5.1 Vorversuche

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass superparamagnetische Nanopartikel, deren Kern aus Eisenoxid besteht, zuverlässig mit den Spezialfärbungen Berliner-Blau und Turnbells in Monolayer-Zellkulturen aus SZ, CZ oder OB nachgewiesen werden können. Die Aufnahme der SPN ins Zytoplasma dieser Zellen konnte damit bei allen verwendeten Partikeln leicht verfolgt und dokumentiert, sowie mittels TEM bestätigt werden. Die dabei verwendeten Arten von SPN unterschieden sich zum einen in der Grösse (10, 30, 130, 250nm), der Art der Herstellung (Micromod, Liquid Research, KTH, EPFL), aber auch dem „Coating“ (Biotin, Streptavidin, Avidin, Gold, Carboxyl). Dabei zeigten Partikel P2 (Magnetit, 130nm, dextranstabilisiert, Avidin-„Coating“), P3 (Magnetit, 250nm, dextranstabilisiert, Avidin-„Coating“) und P15 (Magnetit, 10nm, Avidin-„Coating“) die besten Resultate, indem sie die beste Biokompatibilität, die beste Nachweisbarkeit und die kleinste Aggregatbildung aufwiesen, was den späteren Einsatz im Hauptversuch begründet. Durch die Vorversuche konnte somit eine Aussage getätigt werden, welche Nachweismethoden für SPN in Hinsicht auf Durchführbarkeit, Aussagekraft und Rentabilität sinnvoll für den Hauptversuch erschienen. Ausserdem konnte mit den ausgewählten Methoden ebenfalls die Reaktion der SPN auf die drei Zellarten beurteilt werden.

5.1.1 Zellkulturen

Das Auftauen und Anzüchten der bei -80°C eingefrorenen Zellen (SZ, OB, CZ) erwies sich als leicht reproduzierbare, unproblematische Vorgehensweise. Durch diese Art der Vorkultivierung entfiel für jede Versuchsreihe der langwierige und arbeitsintensive Schritt der Gewebe- und Zellentnahme⁹² sowie der Zellisolierung¹⁰² aus Schlachttieren. Ausserdem konnte in allen Versuchen mit den gleichen Zellen gearbeitet werden, die primär von einem einzigen Individuum stammten und somit alle die gleichen Wachstumseigenschaften aufwiesen.

Die zuerst verwendete Methode der Zellkultivierung auf „Coverslips“ in 6-Loch-Platten erwies sich als ungeeignete Methode für diese Art des Einsatzes, denn erstens mussten sehr

hohe Zellzahlen eingesetzt werden und zweitens war die histologische Färbung der mit Partikeln inkubierten Monolayer auf „Coverslips“ sehr umständlich. Die Kunststoffplättchen waren vom Plattenboden durch kohäsive Kräfte sehr schwer zu entfernen und ein zusätzlicher Schritt des Aufklebens dieser Plättchen auf normale Objektträger musste erfolgen. Ausserdem wurde der Kunststoff des Plättchens durch die Chemikalien des Fixiermittels und der anschliessenden, histologischen Färbung in den meisten Fällen milchig getrübt, so dass keine aussagekräftige, mikroskopische Betrachtung möglich war. Die später angewandte Art der Kultivierung auf 3-Kammer-Objektträgern erwies sich als optimal, da keine chemischen Interaktionen mit dem Glas auftraten, die Zellen direkt auf den Objektträgern angezüchtet werden konnten, die einzusetzende Zellzahl viel geringer war und zugleich noch drei zu vergleichende Ansätze auf einem Objektträger nebeneinander durchgeführt werden konnten. Beim Vergleich des Wachstums der SZ, CZ und OB (siehe auch Tabelle 4.1) stellten sich die SZ als die Zellart heraus, die als Monolayer am schnellsten und leichtesten anwuchs^{16, 74, 79}, sich vermehrte und auf äussere Einflüsse, wie auf toxische Stoffe oder Nährstoffmangel am sensibelsten reagierte, was bereits in der Literatur berichtet wurde²³. Dies konnte vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass CZ und OB einen besseren Schutz durch eine nicht vollständig entfernte extrazellulärer Matrix (Hydroxyapatit, Proteoglykan)⁹², aufweisen. Die Beobachtung des Absterbens der Zellen und des Zelltodes konnte mittels eines Vergleiches mit frischen, sich mit Zellausläufern vermehrenden Zellen gemacht werden. Zelltod wird entweder definiert als Apoptose, bei der der Tod durch Endonukleasen eintritt und schliesslich zu einem Schrumpfen des Zytoplasmas führt oder als Onkose, bei der es durch onkotische Kräfte zu Kern- und Zellschwellung (Tumoren) kommt¹¹⁴. Bei dem Absterben der SZ, CZ und OB wurde durch Zugabe von toxischen Stoffen in die Partikelsuspensionen sehr wahrscheinlich ein apoptotischer Zelltod hervorgerufen, da eine Schrumpfnekrose der Zellen nach dem Einwirken der SPN hervorgerufen wird. In der vorliegenden Arbeit wurde auf einen spezifischen Nachweis des Apoptosevorgangs durch Tunnelassays verzichtet, da das Augenmerk nicht auf die Art des Zelltodes, sondern auf die Nachweismethoden der SPN in Zellkulturen und Geweben gerichtet war.

5.1.2 Histochemie

Zur Durchführung der histochemischen Färbungen (Berlin-Blau, Turnbulls, Quinckes) mussten die Monolayer erst fixiert werden. Wie in Tabelle 4.2 beschrieben, wurden Methanol(100%), Ethanol (100%) und Formalin (4%) dafür verwendet. Als bestes Fixiermittel stellte sich dabei Methanol (100%) heraus, da es weder zu einer Ablösung des Zellrasens, noch zu einer Trübung des Trägermaterials bzw. der Probe, noch in der Immunhistochemie zu einer Eigenfluoreszenz des Fixiermittels führte. Aus diesem Grund wurde beim Hauptversuch ausschliesslich Methanol (100%) zur Zellfixierung verwendet.

Die Quinckes Reaktion zum Nachweis von Eisen(II) und Eisen(III) stellte sich als ungeeignete Färbung heraus, da sich im Färbeschritt bei der Zugabe von Ammoniumsulfidlösung (10%) der Zellrasen ablöste und so keine weitere Färbung der Zellen mehr erfolgen konnte.

Wie schon in mehreren Arbeiten beschrieben^{109, 117, 121}, konnte mit der Berliner-Blau-Färbung der Nachweis von SPN im Lichtmikroskop durchgeführt werden. Zusätzlich konnte mit der Turnbulls-Reaktion ein Nachweis der SPN erreicht werden, obwohl diese Färbemethode im Zusammenhang mit der Charakteristik von SPN bisher kaum erwähnt wurde⁸⁴. Die positive Reaktion mit der Turnbulls-Färbung liess darauf schliessen, dass in allen getesteten Partikeln sowohl Fe (II)- als auch Fe (III)-Ionen vorhanden sind. Im Vergleich untereinander erscheint die Berliner-Blau-Färbung als die geeignetere der Beiden, da die blaue Farbe der Partikel besser von dem rot gefärbten Zellkulturen abstach und vom menschlichen Auge besser erfasst werden konnte.

5.1.3 Immunhistochemie

Die direkte Immunhistochemie mit den Partikeln P4, P5, d.h. mit Biotin ummantelten SPN führte zu keinem positiven Ergebnis. Es zeigte sich keine Fluoreszenz nach der Reaktion von dem Partikel mit dem Streptavidin-FITC-Antikörper, obwohl in der Literatur Nachweise ähnlicher Nanopartikeln mit Hilfe von FITC beschrieben wurden^{45, 91, 103, 105, 118}. Allerdings wurden dabei nicht genau dieselben SNP-Arten verwendet. Der Grund, warum keine Bindung entstand liegt vermutlich daran, dass das Biotin nicht fest (chemisch oder physikalisch) am Partikel gebunden war und so durch die mehrmaligen Waschvorgänge vor der Antikörperzugabe das Biotin abgelöst wurde. Die Bindung zwischen Biotin und Streptavidin

wird in der Literatur normalerweise als eine irreversible Bindung mit einer hohen Affinität zueinander beschrieben³⁹ und in vielen pharmazeutischen und biotechnischen Bereichen angewandt. Diese Bindungseigenschaften werden vor allem auch bei der DNA-Sequenzierung, PCR-Technologie und der Reinigung von DNA-Proteinen verwendet^{41, 48, 95}. Ausserdem besitzen diese Proteine eine sehr hohe Resistenz gegen Hitze, extreme pH-Werte, organische Säuren und proteolytische Enzyme. Aus diesem Grund kann mit Sicherheit die Ablösung der Biotin-Moleküle und damit das nicht Zustandekommen einer Interaktion zwischen Biotin und Streptavidin als Ursache für den fehlenden Partikelnachweis angenommen werden.

Die indirekte Immunhistochemie mit Antigen, primärem und sekundärem Antikörper, wurde mit Partikel P2, P3, P6, P7 und P15 durchgeführt. Bei den Streptavidin ummantelten P6 und P7 wurde als erster AK ein Biotin-Mouse-AK und anschliessend ein Anti-Mouse-FITC-AK verwendet. Da zwischen den zwei Proteinen, Biotin und Streptavidin, eine sehr hohe Affinität existiert, wäre aus den im vorhergehenden Absatz erwähnten Gründen³⁹ eine sehr starke Antigen-Antikörper-Reaktion zu erwarten gewesen. Dass es nicht dazu kam, liegt höchstwahrscheinlich an der zu gering anhaftenden Ummantelung der Streptavidin-Gruppen am SPN und somit an einer vorzeitig, durch mechanische Einwirkung des histochemischen Prozesses, hervorgerufenen Abspaltung der Proteine.

Die einzigen, positiven Antigen-AKI-AKII-Reaktionen konnten mit P2, P3 und P15 durchgeführt werden, da diese SPN mit Avidin-Gruppen ummantelt waren und die Anhaftung dieses Proteins am Partikel vermutlich stärker war als bei Biotin oder Streptavidin. Diese Tatsache könnte darauf beruhen, dass zwischen Avidin als oberflächenaktive Substanz und dem SPN höhere Anziehungskräfte (Elektrostatische Kräfte, van der Waals Kräfte, Hydrophobische Interaktionen)^{2, 24} bestehen, als mit Biotin oder Streptavidin an der Oberfläche. Ein weiterer Unterschied zwischen Streptavidin und Avidin besteht darin, dass Avidin eine Kohlenhydratkette besitzt, was diesem Protein einen basischen isoelektrischen Punkt verschafft. Dagegen ist Streptavidin frei von Kohlenhydratketten und besitzt somit einen neutralen isoelektrischen Punkt³⁹.

5.2 Hauptversuch

Da in den Vorversuchen nur Partikel P2, P3 und P15 eine positive Immunfluoreszenz zeigten und alle verschiedenen Nachweismethoden (Berliner-Blau-Reaktion, Turnbells-Reaktion, Immunfluoreszenz, TEM, Local Susceptibility) mit den gleichen SPN durchgeführt werden sollten, wurde beschlossen, nur diese drei Partikel für den Hauptversuch zu verwenden.

Von den Kriterien des semiquantitativen Scoring-Systems: Anteil toter Zellen, Partikel im Zytoplasma, Zellform, Sichtbarkeit einzelner Partikel und Ausgespartheit des Kernes, wurden nur die ersten 3 für die nähere Beurteilung in Betracht gezogen, da die anderen Punkte keine weiteren Erkenntnisse über die Verträglichkeit, d.h. Toxizität oder die Aufnahmefähigkeit der Partikel in die Zellen gebracht hatten.

5.2.1 Histochemie

Sowohl die Turnbells-, als auch die Berliner-Blau-Reaktion liessen alle drei gewählten Partikel deutlich anfärben. Daraus konnte gefolgert werden, dass alle Partikel sowohl aus Fe^{2+} -, als auch Fe^{3+} -Ionen aufgebaut sind. Von der Färbetechnik her gesehen sind beide Methoden ähnlich und einfach, so dass man bei der Anwendung von diesen histochemischen Nachweisen für SPN am besten beide durchführt. Da es vor allem im Hinblick auf zukünftige Versuche beim Nachweis von SPN im Gewebe nicht möglich ist das dreiwertige Eisen des Hämoglobins vom dreiwertigen Eisen eines SPN durch die Berliner-Blau-Färbung zu unterscheiden, kann die Turnbells-Reaktion dafür verwendet werden um diesen Unterschied darzustellen. Wenn ein Gewebe mit beiden Färbungen positiv reagiert kann daraus gefolgert werden, dass die positive Reaktion durch SPN erfolgt. Ist nur die Berliner-Blau-Färbung positiv, wird diese Reaktion mit grösster Wahrscheinlichkeit durch das Hämosiderin-Eisen verursacht ⁹³.

Hinsichtlich der Empfindlichkeit der Zellarten auf Noxen konnten Synovialzellen als die Zellen herausgefiltert werden, die als erste und am intensivsten darauf reagieren, was erneut die Beobachtung von Neuberger ⁹² bestätigte. Der Grund dafür liegt vermutlich in der nicht vollständig entfernten extrazellulären Matrix (Hydroxyapatit, Proteoglykan) der CZ und OB, die einen besseren Schutz dieser Zellen gegen äussere Einwirkungen bietet.

Bei der Partikelaufnahme der drei verschiedenen Zellarten in das Zytoplasma, nahmen ausserdem die Synovialzellen die SPN am schnellsten auf, was ebenfalls auf die

ausgepägtesten makrophagischen Eigenschaften dieser Zellen hinweist und auch schon anderweitig beschrieben worden ist⁸⁶.

Beim Vergleich der verschiedenen Partikel und der Reaktionen der verschiedenen Zellen, zeigten P3 im Lichtmikroskop die beste intrazelluläre Aufnahme, was sicherlich durch die Grössenunterschiede der verschiedenen Partikel zu erklären ist. Zellen mit makrophagischen Eigenschaften, was für alle drei verwendeten Zellarten zutrifft, nehmen Fremdstoffe mit einer Grösse zwischen 0,1 μm und 1,0 μm besser auf als grössere und kleinere Fremdstoffe¹⁰. Durch die zu starke Aggregatbildung von P2 und der zu kleine Partikeldurchmesser von 10 - 30nm von P15 konnte damit die Beobachtung, dass P2 und P15 schlechter intrazytoplasmatisch aufgenommen wurden, erklärt werden.

Die Aggregation von SPN konnte auf die verschiedenen interpartikulären Anziehungskräfte (van der Waals Kräfte, elektrostatische Kräfte)^{2, 24} zurückgeführt werden. Somit hatte P3 geringere Kräfte zwischen den einzelnen Partikeln aufzuweisen als P2, vor allem mit dem grösseren Durchmesser von P3 zusammenhängt.

Der Vergleich der Konzentrationen zwischen 2,5 und 0,625mg/ml konnte keine erkennbaren Unterschiede in der Toxizität oder Biokompatibilität liefern. Dies liegt vermutlich daran, dass diese Konzentrationen weit unter der Konzentration von 5mg/ml liegen, welche bereits in den Versuchen von Neuberger sehr gute Resultate geliefert hatte und als die toxische Grenzdosis angegeben wurde⁹².

Bei den verschiedenen Inkubationszeiten wurde ersichtlich, dass bei einer Zeit von 48h die Anzahl der abgestorbenen Zellen beträchtlich steigt. Dies lag vor allem daran, dass bei einer Kultivierung ab 48h einige Nährstoffe im Nährmedium bereits verbraucht und eine Ansammlung von Stoffwechselprodukten der Zellen vorhanden waren und somit die Absterberate der Zellen ohne Wechsel des Kulturmediums auch ohne Partikel auf jeden Fall gestiegen wäre³. Deshalb konnte auch gezeigt werden, dass die Zellen bei P2 und P3 im Vergleich zu P15 keine erkennbare Zellapoptose durch toxische Stoffe aufwiesen. Der apoptotische Zelltod bei P15 konnte anhand fransiger und somit nicht mehr intakter Zellmembran beobachtet werden. Auf einen genaueren Apoptosenachweis wurde wegen bereits vorhandener Ergebnisse von Neuberger⁹² verzichtet. Eine Beeinträchtigung des Zellwachstums durch den Einfluss der Magneten konnte nicht ausgeschlossen werden, erscheint allerdings als unrealistisch. Zum einen trat das Problem sowohl mit als auch ohne Magnet auf, und zum anderen konnten auch keine Hinweise darüber in der Literatur gefunden

werden. Vorversuche bei Neuberger⁹² zeigten überdies keine Unterschiede bei Zellkulturen mit oder ohne Magneten.

5.2.2 Immunhistochemie

Der Grund dafür, dass nur die Avidin ummantelten Partikel (P2, P3, P15) eine positive Reaktion bei der Immunfluoreszenz hervorriefen, wurde bereits bei den Vorversuchen (Kapitel 5.1.3) diskutiert.

Die Tatsache, dass die einen Versuchsansätze zu keinem fluoreszierenden Ergebnis führten und andere schon, konnte nicht vollständig erklärt werden. Sämtliche negativ verlaufenen Versuche wurden mehrmals wiederholt und dabei traten wiederum willkürlich einige positive und einige negative Proben auf, obwohl der Versuchsansatz völlig identisch war. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass die Ursache in diesen Fällen im Waschprozess während den Färbungen zu suchen war.

Die Auswertung der wenigen positiv verlaufenen immunfluoreszierenden Ansätze liess allerdings erkennen, dass nach 2h kaum Partikel zellassoziiert vorlagen, was man an der verstreuten, über die ganze Probe vorliegenden, Fluoreszenz erkennen konnte (Abb. 4.31, 4.33, 4.35). Nach 24 Stunden dagegen war die Fluoreszenz zellgebunden im Mikroskop erkennbar. Genau wie bei der Histochemie konnte auch hier zwischen den grün fluoreszierenden Fluoreszenzflecken ein ovaler, schwarzer Bereich erkannt werden, der vergleichbar mit der Histologie den Zellkern darstellte. Um diesen Verdacht der nur intrazytoplasmatischen Aufnahme der SPN zu beweisen, wurde anschliessend eine TEM der gleichen Proben angefertigt (siehe Kapitel 5.2.3). Bei der nach 48 Stunden beginnenden multifokalen Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes bei den SZ, konnte zum einen eine Zerstörung der Zellmembran durch die Toxizität der Partikel vermutet werden, da auch in der Histochemie eine vermehrte Absterberate mit Zellablösung und ausgefranster Zytoplasmamembran bei diesem Partikel festzustellen war. Zum anderen würde als zweite Ursache eine mögliche Abspaltung der Avidin-Moleküle nach 48 Stunden vom SPN und somit zu einer Streuung des Fluoreszenzfarbstoffes in Frage kommen. Um dieses Problem abzuklären, wurden die TEMPräparate angefertigt. Dabei wurde leicht erkennbar, dass es nach 48 Stunden zu einem beginnenden apoptotischen Absterbeprozess der SZ kam.

Die Tatsache, dass P15 eine weniger intensive Fluoreszenz aufwies, lag an dem viel kleineren Partikeldurchmesser von ca. 30nm. Demnach ist der Umfang dieser SPN im Vergleich zu dem

der Partikel P3 ($\varnothing = 250\text{nm}$) um ca. achtmal kleiner. Deshalb waren nur 1/8 an Avidin-Molekülen an diese Partikel gebunden, womit logischerweise die Fluoreszenz nur etwa 1/8 so intensiv leuchten konnte.

5.2.3 TEM

Um die Resultate der Auswertung der Histochemie und der Immunhistochemie von Kapitel 4.1 - 4.5 zu bestätigen, bzw. zu widerlegen, wurde von den jeweiligen Versuchsansätzen eine TEM angefertigt. Diese Methode der Sichtbarmachung der SPN wurde in sehr vielen Studien der Partikelherstellung und des Partikeleinsatzes durchgeführt^{37, 40, 47, 55, 57, 69, 122}, da sie zu heutigen Zeitpunkt die sensitivste Methode des Partikelnachweises darstellt. Allerdings ist diese Methode derzeit auch die teuerste, die aufwendigste und die komplizierteste Methode. Somit kann diese Methode nicht als Routinenachweis für SPN empfohlen werden. Aus diesen Gründen wurde die Anzahl der Proben auch beschränkt und nur mit zwei und 48 Stunden Inkubationszeit gearbeitet und jeweils nur die Konzentration von 2,5mg/ml verwendet.

Mit dieser Art der Partikelcharakterisierung kann sowohl die Partikelgrösse festgestellt werden, als auch Veränderungen der SPN, wie z.B. Aggregatbildungen^{37, 47, 57, 78, 122}.

Ausserdem kann damit genau beobachtet werden, ob die SPN von den Zellen und Geweben aufgenommen^{40, 53, 55, 69} und in das Zytoplasma oder in den Zellkern eingeschleust wurden, oder ob sie gar nicht in den intrazellulären Raum gelangen konnten.

Die in allen Proben festgestellte, intrazytoplasmatische Aufnahme der Partikel wurde auch schon bei Lymphozyten¹⁴⁴, Makrophagen³³, Karzinomzellen⁵⁵ oder T-Zellen¹⁴¹ nachgewiesen. Allerdings wurden in der vorliegenden Studie keinerlei Partikel im Zellkern von SZ, OB und CZ entdeckt, was auf einen Transportmechanismus für die Partikel hindeuten lässt, welcher nur in der Zell-, nicht aber in der Kernmembran vorhanden ist. Als mögliche Transportmechanismen kann man sich die einfache Diffusion durch die Lipidphase der Zellmembran, die Endozytose oder die Phagozytose vorstellen. Der wahrscheinlichste Transportweg wird die Endozytose sein, da dabei das aufgenommene Material in Vesikel eingeschleust und schliesslich abgebaut oder wieder durch Exozytose abgegeben wird¹²⁰. Da sämtliche SPN eine Oberflächenladung aufweisen, die als Zeta-Potential angegeben wird⁷⁷, erfährt jede Art des Partikels einen unterschiedlichen Endozytoseindex. Besitzt das Zeta-Potential eines Partikels einen Wert gegen Null, ist die zytoplasmatische Aufnahme am

geringsten⁶⁵. Die Phagozytose steigt im Gegensatz dazu mit zunehmender Ladung, sowohl im positiven, als auch im negativen Bereich⁹⁰.

Die Beobachtung, dass die SZ die grösste Absterberate aufwies, wurde nicht nur in der Histochemie sondern auch mit der TEM gemacht. Der Grund dafür liegt vermutlich an der vollständig entfernten extrazellulären Matrix der SZ⁹² (vergleiche Kapitel 5.2.1), was in den elektronenmikroskopischen Bildern an einer dickeren Zellmembran der OB und CZ zu erahnen ist.

Der Grund der vermehrten Bildung von aggregierten Partikelhaufen, wie bei P2 festgestellt, kann mit der unterschiedlichen Oberflächenladung von P2 im Vergleich zu P3 begründet werden. Unterschreitet die Oberflächenladung, die sich im Zeta-Potential widerspiegelt, einen bestimmten Wert, so kommt es zur Aggregation und Ausflockung der SPN. Deshalb wird das Zeta-Potential auch als Mass für die Stabilität dispergierter Partikel verwendet⁹².

Dadurch dass P15 auch bei der TEM als der SPN mit der höchsten Toxizität aufgefallen war, was vermutlich an der Unreinheit des Lösungsmittels nach der Herstellung der Partikel lag und nicht am Partikel selber, lässt den späteren *in vivo* Einsatz dieses Partikels nicht zu. Da SPN neben dem Einsatz als Trägerstoff für Arzneimittel (AM) auch als Kontrastmittel für MRT verwendet werden soll, müssen diese SPN auch die Toxizitätsprüfungen von AM bestehen, bevor sie zum *in vivo* Gebrauch zugelassen werden können.

Sämtliche Beobachtungen, die in den vorhergegangenen Versuchen, d.h. in der Histochemie (Kapitel 5.2.1) und der Immunhistochemie (Kapitel 5.2.2) gemacht wurden, konnten somit durch die TEM bestätigt werden.

5.2.4 „Mapping Local Susceptibility“

Die Methode der Messung der „Local Susceptibility“ wird vor allem in der Physik eingesetzt, um die magnetische Verteilung z.B. auf Trägern zu messen und sichtbar zu machen. Dies kann so z.B. als Test bei magnetischen Chips angewandt werden^{124, 125}. In unserem Fall bestand die Idee darin, die superparamagnetischen Partikel, die mit Zellkulturen inkubiert wurden, zu charakterisieren. Dadurch, dass die Auflösung des Gerätes sehr niedrig ist, konnte zwar ein Nachweis von magnetischem Material erbracht werden, allerdings konnten damit keine Aussagen über Zellreaktionen und Partikeleigenschaften gemacht werden. Dort ist vermutlich auch der Grund zu suchen, dass diese Methode zur Charakterisierung von SPN in Geweben bis jetzt in der Literatur nicht beschrieben wurde.

Die einzige Aussage, dass SPN von CZ und OB später als von SZ aufgenommen wurden, konnte anhand der gelieferten Bilder bestätigt werden, was allerdings in den vorhergegangenen histochemischen Versuchen deutlicher zu erkennen war.

Die Tatsache, dass P15 bei der „Local Susceptibility“ in keiner einzigen Probe sichtbar gemacht werden konnte, liegt vermutlich daran, dass dieser Partikel bessere superparamagnetische Eigenschaften besitzt, weil er kleiner ist und so während der Messung ohne eine externe magnetische Quelle keinen Magnetismus aufweist.

Für weitere Versuche wäre es denkbar diese Methode bei z.B. Gewebeproben nur anzuwenden, um festzustellen, ob in den speziellen Geweben magnetische Momente zu finden sind. Das würde darauf hindeuten, dass in der Probe SPN vorhanden sind, sofern diese ohne externe magnetische Quelle durch ihre Grösse magnetische Eigenschaften aufweisen. Es wird allerdings mit dieser Methode kaum eine Aussage über die Quantität und die Qualität der SPN getroffen werden können.

5.3 Zusammenfassung

Die histochemischen Färbungen, Berliner Blau und Turnbulls, stellen eine relativ einfache, schnelle und kostengünstige Methode zur Charakterisierung von Eisenoxid-SPN dar. Allerdings sollten immer beide Färbungen parallel durchgeführt werden, damit man beim Nachweis von SPN z.B. in histologischen Geweben das Hämosiderin-Eisen (Fe^{3+}) vom Eisen der Partikel (Fe^{2+} und Fe^{3+}) differenzieren kann. Hämosiderin-Eisen färbt sich nur mit Berliner Blau, wogegen sich das Eisen der SPN mit beiden Methoden anfärben lässt. Um einige Proben näher und genauer zu charakterisieren, ist es sinnvoll eine Untersuchung mit TEM davon zu machen, da die einzelnen Partikel und vor allem die intrazelluläre Aufnahme der SPN besser zu beurteilen sind. Der Nachweis der SPN durch Immunfluoreszenz bringt keinen näheren Aufschluss bei der Partikelcharakterisierung, so dass für spätere *in vivo* Versuche diese relativ aufwendige und aussageschwache Methode nicht sinnvoll erscheint. Die Methode der Local Susceptibility kann beim jetzigen Stand der Entwicklung nur dazu verwendet werden, um magnetisches Material in Geweben zu identifizieren, was allerdings bei sehr kleinen SPN auch zweifelhaft erscheint.

Um zukünftig Partikel vor einem *in vivo* Einsatz auf Toxizität zu prüfen, ist es zumindest für den Einsatz im Bewegungsapparat möglich nur SZ dafür zu verwenden, da sie im Vergleich zu CZ und OB die Zellart darstellt, die am leichtesten zu kultivieren ist und am schnellsten auf toxische Stoffe reagiert.

Von den drei im Hauptversuch getesteten Partikeln schneidet P3 am besten ab. Diese Partikel zeigen den geringsten negativen Einfluss auf die Zellen und bilden während des Testes keine Aggregate aus. P2 aggregieren dagegen sehr schnell und P15 verursachen nach relativ kurzer Zeit ein Absterben der Zellen, was auf eine relativ hohe Toxizität hindeutet.

Die in der Arbeit von Neuberger⁹² festgesetzte toxische Dosis von 5mg/ml konnte bestätigt werden, wobei es für spätere *in vivo* Versuche sinnvoll erscheint die Dosis auf 2,5mg/ml zu reduzieren. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit der Aggregatbildung erheblich verringert.

Bei Versuchsansätzen mit SPN zur Toxizitätsprüfung erscheinen die Inkubationszeiten von 2, 24, 48 Stunden recht sinnvoll. Allerdings könnten längere Inkubationszeiten mit 72 und 120h weitere Informationen liefern, da bei dieser Kultivierung der Einfluss des Mediumwechsels während der Inkubation mit einbezogen werden könnte.

5.4 Zukunftsperspektiven

Nach den Ergebnissen der ersten Studie von Neuberger⁹² über die „Wirkung von SPN auf Zellen des Bewegungsapparates; *In vitro* Studie an OB, CZ und SZ“ und den Resultaten der vorliegenden Arbeit: „Chemische und physikalisch Nachweismethoden Superparamagnetischer Nanopartikeln zur Beurteilung deren Wirkung auf Zellen des Bewegungsapparates“ können nun weitere Schritte geplant werden. Diese stellen den erstmaligen Einsatz der, aus den *in vitro* Versuchen resultierenden, besten Partikel *in vivo* dar. Vor jedem *in vivo* Einsatz einer neuen Partikelart ist es, anhand der zwei Studien möglich, diese zuerst an Zellen *in vitro* nach dem vorgelegten Schema zu untersuchen. Dieses Schema umfasst die Messung von Entzündungsparametern, die Anfertigung von partikelinkubierten Zellkulturen nach verschiedenen Inkubationszeiten mit anschliessenden histologischen Färbungen (Berliner-Blau, Turnbulls, H.E.) und die anschliessende Auswertung unter dem Lichtmikroskop. Falls eine Partikelart diese Schritte der *in vitro* Versuche ohne negative Ergebnisse für die Zellen überstanden hat, so wie es bei P3 der Fall ist, ist eine Versuchsreihe *in vivo* möglich.

Im Falle der vorliegenden Partikel werden weiterhin Versuche mit geplant, bei denen diese intra-, und periartikulär in die Karpalgelenke und Kniegelenke von Schafen injiziert werden sollen. Die Tötung der Tiere sollte dann nach 3, 24, 72 und 120 Stunden post injectionem erfolgen. Es ist vorgesehen dann Gewebeproben von Synovialmembran, Gelenkknorpel, angrenzenden Lymphknoten, Lunge, Nieren, Leber, Milz und Harnblase zu entnehmen und an den Gewebeschnitten die Berliner-Blau-Färbung, die Turnbulls-Färbung und eine H.E.-Färbung durchzuführen, um die Bioverträglichkeit, die Abschwemmung von der Injektionsstelle und schliesslich die Verteilung im Körper zu untersuchen. Ausserdem soll der Unterschied zwischen Gelenken untersucht werden, bei denen ein externer Dauermagnet am Gelenk befestigt wurde und bei solchen ohne Magnetapplikation.

6 Anhang

Tabelle 6.1: "Score"-Auswertung der Berliner-Blau-Färbung von Synovialzellen

Synovialzellen-Berliner Blau			Anteil toter Zellen	Eizelne Partikel sichtbar	Zellkern ausgespart	Partikel im Zytoplasma	Zellform	Partikel sichtbar
nanomag- avidin 130nm:	2 h	2.5 mg/ml	1	1	3	0	2	2
		1.25 mg/ml	1	1	3	0	2	2
		0.625 mg/ml	0	2	3	0	2	2
	12 h	2.5 mg/ml	1	2	2	2	2	2
		1.25 mg/ml	1	1	2	2	2	2
		0.625 mg/ml	1	2	2	2	2	2
	24 h	2.5 mg/ml	2	1	3	2	2	2
		1.25 mg/ml	1	1	3	2	1	2
		0.625 mg/ml	1	1	3	2	1	2
	48 h	2.5 mg/ml	3	1	0	0	0	2
		1.25 mg/ml	2	1	2	1	0	2
		0.625 mg/ml	2	2	2	2	0	2
nanomag- avidin 250nm:	2 h	2.5 mg/ml	0	3	2	1	3	2
		1.25 mg/ml	0	3	1	1	3	2
		0.625 mg/ml	0	3	3	0	3	1
	12 h	2.5 mg/ml	1	2	2	3	2	2
		1.25 mg/ml	1	2	2	3	2	2
		0.625 mg/ml	1	2	2	2	2	2
	24 h	2.5 mg/ml	2	2	0	3	1	2
		1.25 mg/ml	2	2	1	2	1	2
		0.625 mg/ml	2	2	1	2	1	2
	48 h	2.5 mg/ml	3	2	0	0	0	1
		1.25 mg/ml	3	2	0	0	0	1
		0.625 mg/ml	3	2	0	0	0	1
liquid research- plain 10nm:	2 h	2.5 mg/ml	2	0	3	0	2	0
		1.25 mg/ml	2	0	3	0	1	1
		0.625 mg/ml	2	0	3	0	1	1
	12 h	2.5 mg/ml	2	1	3	2	1	1
		1.25 mg/ml	2	0	3	1	1	1
		0.625 mg/ml	1	0	3	0	2	0
	24 h	2.5 mg/ml	2	0	3	1	1	1
		1.25 mg/ml	2	0	3	1	1	1
		0.625 mg/ml	2	0	3	1	1	1
	48 h	2.5 mg/ml	1	1	3	1	1	1
		1.25 mg/ml	1	1	3	1	1	1
		0.625 mg/ml	1	1	3	3	1	2

Tabelle 6.2: "Score"-Auswertung der Berliner-Blau-Färbung von Chondrozyten

Chondrozyten-Berliner Blau			Anteil toter Zellen	Eizelne Partikel sichtbar	Zellkern ausgespart	Partikel im Zytoplasma	Zellform	Partikel sichtbar
nanomag- avidin 130nm:	2 h	2.5 mg/ml	1	1	2	0	3	2
		1.25 mg/ml	0	2	2	0	3	2
		0.625 mg/ml	0	2	3	0	3	2
	12 h	2.5 mg/ml	1	1	3	2	3	2
		1.25 mg/ml	0	2	3	3	3	2
		0.625 mg/ml	0	2	3	3	3	2
	24 h	2.5 mg/ml	2	1	1	3	2	2
		1.25 mg/ml	1	2	2	3	2	2
		0.625 mg/ml	0	2	3	3	2	2
	48 h	2.5 mg/ml	2	1	1	3	2	2
		1.25 mg/ml	1	2	2	3	2	2
		0.625 mg/ml	1	2	2	3	2	2
nanomag- avidin 250nm:	2 h	2.5 mg/ml	0	3	3	1	3	2
		1.25 mg/ml	0	3	3	1	3	2
		0.625 mg/ml	0	3	3	0	3	2
	12 h	2.5 mg/ml	1	2	2	3	3	2
		1.25 mg/ml	1	2	3	3	2	2
		0.625 mg/ml	1	2	2	3	2	2
	24 h	2.5 mg/ml	0	3	3	3	3	2
		1.25 mg/ml	0	3	3	3	3	2
		0.625 mg/ml	0	3	3	3	3	2
	48 h	2.5 mg/ml	2	2	1	3	1	2
		1.25 mg/ml	2	1	1	3	1	2
		0.625 mg/ml	2	1	1	3	1	2
liquid research- avidin 10nm:	2 h	2.5 mg/ml	0	0	3	0	3	1
		1.25 mg/ml	0	0	3	0	2	1
		0.625 mg/ml	0	0	3	0	2	1
	12 h	2.5 mg/ml	1	0	3	1	2	1
		1.25 mg/ml	1	0	3	0	2	0
		0.625 mg/ml	0	1	2	1	2	1
	24 h	2.5 mg/ml	1	1	3	3	1	2
		1.25 mg/ml	1	1	3	3	1	2
		0.625 mg/ml	1	1	3	3	2	2
	48 h	2.5 mg/ml	1	1	3	3	1	1
		1.25 mg/ml	1	1	3	3	1	2
		0.625 mg/ml	1	2	3	2	2	1

Tabelle 6.3: “Score“-Auswertung der Berliner-Blau-Färbung von Osteoblasten

Osteoblasten-Berliner Blau			Anteil toter Zellen	Einzelne Partikel sichtbar	Zellkern ausgespart	Partikel im Zytoplasma	Zellform	Partikel sichtbar
nanomag- avidin 130nm:	2 h	2.5 mg/ml	0	2	3	0	3	2
		1.25 mg/ml	0	2	3	0	2	2
		0.625 mg/ml	0	2	3	0	3	2
	12 h	2.5 mg/ml	1	1	2	2	3	2
		1.25 mg/ml	0	2	3	2	3	2
		0.625 mg/ml	0	2	2	2	3	2
	24 h	2.5 mg/ml	1	2	2	2	3	2
		1.25 mg/ml	1	2	3	3	2	2
		0.625 mg/ml	1	2	2	2	2	2
	48 h	2.5 mg/ml	2	2	3	2	1	2
		1.25 mg/ml	1	2	3	3	2	2
		0.625 mg/ml	1	2	3	3	2	2
nanomag- avidin 250nm:	2 h	2.5 mg/ml	0	2	3	0	3	2
		1.25 mg/ml	0	2	3	0	3	2
		0.625 mg/ml	0	3	2	1	3	1
	12 h	2.5 mg/ml	1	2	3	2	2	2
		1.25 mg/ml	1	2	3	2	2	2
		0.625 mg/ml	1	2	3	3	3	2
	24 h	2.5 mg/ml	1	2	2	3	2	2
		1.25 mg/ml	1	2	3	3	2	2
		0.625 mg/ml	1	3	3	3	2	2
	48 h	2.5 mg/ml	1	2	3	3	2	2
		1.25 mg/ml	2	2	3	3	2	2
		0.625 mg/ml	1	2	3	3	3	2
liquid research- avidin 10nm:	2 h	2.5 mg/ml	0	0	3	0	2	1
		1.25 mg/ml	0	0	3	0	2	1
		0.625 mg/ml	0	0	3	0	3	0
	12 h	2.5 mg/ml	1	1	3	2	2	1
		1.25 mg/ml	1	0	3	1	2	1
		0.625 mg/ml	0	0	3	0	3	0
	24 h	2.5 mg/ml	1	1	3	3	2	2
		1.25 mg/ml	1	1	3	3	2	2
		0.625 mg/ml	1	2	3	3	2	2
	48 h	2.5 mg/ml	0	2	3	2	2	2
		1.25 mg/ml	0	1	3	1	2	1
		0.625 mg/ml	3	1	3	0	0	0

Tabelle 6.4: “Score“-Auswertung der Turnbolls-Färbung von Synovialzellen

Synovialzellen-Turnbolls			Anteil toter Zellen	Einzelne Partikel sichtbar	Zellkern ausgespart	Partikel im Zytoplasma	Zellform	Partikel sichtbar
nanomag- avidin 130nm:	2 h	2.5 mg/ml	1	1	3	1	2	2
		1.25 mg/ml	1	2	3	1	2	2
		0.625 mg/ml	1	1	3	1	2	2
	12 h	2.5 mg/ml	1	2	2	2	1	2
		1.25 mg/ml	1	2	2	2	2	2
		0.625 mg/ml	1	2	2	2	2	2
	24 h	2.5 mg/ml	1	1	2	2	1	2
		1.25 mg/ml	1	1	2	2	1	2
		0.625 mg/ml	1	2	2	2	1	2
	48 h	2.5 mg/ml	3	1	2	2	0	2
		1.25 mg/ml	3	1	2	2	0	2
		0.625 mg/ml	3	1	2	2	0	2
nanomag- avidin 250nm:	2 h	2.5 mg/ml	0	3	2	1	3	2
		1.25 mg/ml	0	3	2	1	3	2
		0.625 mg/ml	0	3	2	1	3	2
	12 h	2.5 mg/ml	1	3	2	3	1	2
		1.25 mg/ml	2	3	2	3	1	2
		0.625 mg/ml	1	2	2	3	1	2
	24 h	2.5 mg/ml	1	3	1	3	1	2
		1.25 mg/ml	3	3	0	0	0	2
		0.625 mg/ml	2	3	0	2	1	2
	48 h	2.5 mg/ml	3	3	0	0	0	2
		1.25 mg/ml	3	3	0	0	0	2
		0.625 mg/ml	3	3	1	3	1	2
liquid research- avidin 10nm:	2 h	2.5 mg/ml	1	0	3	1	2	1
		1.25 mg/ml	1	0	3	1	2	1
		0.625 mg/ml	1	0	3	1	2	1
	12 h	2.5 mg/ml	2	0	3	1	1	1
		1.25 mg/ml	2	0	3	1	1	1
		0.625 mg/ml	1	0	3	1	2	1
	24 h	2.5 mg/ml	1	0	3	1	1	1
		1.25 mg/ml	1	0	3	1	2	1
		0.625 mg/ml	2	0	3	1	2	1
	48 h	2.5 mg/ml	3	1	2	2	0	1
		1.25 mg/ml	2	0	3	1	1	1
		0.625 mg/ml	2	0	3	1	1	1

Tabelle 6.5: “Score“-Auswertung der Turnbulls-Färbung von Chondrozytenen

Chondrozyten-Turnbulls			Anteil totor Zellen	Eizelne Partikel sichtbar	Zellkern ausgespart	Partikel im Zytoplasma	Zellform	Partikel sichtbar
nanomag- avidin 130nm:	2 h	2.5 mg/ml	1	0	3	0	3	2
		1.25 mg/ml	0	0	3	0	3	2
		0.625 mg/ml	0	1	3	0	3	2
	12 h	2.5 mg/ml	1	1	3	1	2	2
		1.25 mg/ml	0	1	3	1	2	2
		0.625 mg/ml	0	2	3	1	2	2
	24 h	2.5 mg/ml	2	0	2	2	1	2
		1.25 mg/ml	2	0	2	2	2	2
		0.625 mg/ml	1	1	2	2	2	2
	48 h	2.5 mg/ml	2	1	2	2	1	2
		1.25 mg/ml	2	1	2	2	1	2
		0.625 mg/ml	1	1	2	2	1	2
nanomag- avidin 250nm:	2 h	2.5 mg/ml	0	3	2	1	3	2
		1.25 mg/ml	0	3	2	1	3	2
		0.625 mg/ml	0	3	2	1	3	2
	12 h	2.5 mg/ml	1	1	1	3	2	2
		1.25 mg/ml	1	2	2	3	2	2
		0.625 mg/ml	2	2	2	3	2	2
	24 h	2.5 mg/ml	0	3	3	3	2	2
		1.25 mg/ml	1	3	3	2	2	2
		0.625 mg/ml	1	3	3	3	1	2
	48 h	2.5 mg/ml	2	2	2	3	1	2
		1.25 mg/ml	1	2	2	3	1	2
		0.625 mg/ml	1	1	2	3	2	2
liquid research- avidin 10nm:	2 h	2.5 mg/ml	1	0	3	1	2	1
		1.25 mg/ml	1	0	3	1	2	1
		0.625 mg/ml	1	0	3	1	2	1
	12 h	2.5 mg/ml	1	0	3	1	2	1
		1.25 mg/ml	1	0	3	1	2	1
		0.625 mg/ml	1	0	3	1	2	1
	24 h	2.5 mg/ml	2	1	3	3	1	1
		1.25 mg/ml	2	1	3	3	2	1
		0.625 mg/ml	2	1	3	3	2	1
	48 h	2.5 mg/ml	2	0	3	3	2	1
		1.25 mg/ml	2	0	3	3	2	1
		0.625 mg/ml	2	0	3	3	2	1

Tabelle 6.6: “Score“-Auswertung der Turnbulls-Färbung von Osteoblasten

Osteoblasten-Turnbulls			Anteil totor Zellen	Eizelne Partikel sichtbar	Zellkern ausgespart	Partikel im Zytoplasma	Zellform	Partikel sichtbar
nanomag- avidin 130nm:	2 h	2.5 mg/ml	1	1	3	1	3	2
		1.25 mg/ml	0	1	3	1	3	2
		0.625 mg/ml	0	2	3	1	3	2
	12 h	2.5 mg/ml	1	2	2	2	3	2
		1.25 mg/ml	1	2	2	2	2	2
		0.625 mg/ml	0	2	2	2	3	2
	24 h	2.5 mg/ml	1	1	3	2	2	2
		1.25 mg/ml	0	2	3	3	2	2
		0.625 mg/ml	0	2	2	2	2	2
	48 h	2.5 mg/ml	1	1	3	3	1	2
		1.25 mg/ml	1	2	3	2	1	2
		0.625 mg/ml	0	2	3	3	1	2
nanomag- avidin 250nm:	2 h	2.5 mg/ml	2	3	3	0	3	2
		1.25 mg/ml	2	3	3	0	3	2
		0.625 mg/ml	2	3	3	0	3	2
	12 h	2.5 mg/ml	2	3	2	2	0	2
		1.25 mg/ml	2	3	3	3	0	2
		0.625 mg/ml	1	3	2	3	1	2
	24 h	2.5 mg/ml	2	3	3	3	1	2
		1.25 mg/ml	2	3	3	3	1	2
		0.625 mg/ml	2	3	3	3	1	2
	48 h	2.5 mg/ml	2	3	3	3	2	2
		1.25 mg/ml	2	3	3	3	2	2
		0.625 mg/ml	2	3	3	3	1	2
liquid research- avidin 10nm:	2 h	2.5 mg/ml	1	0	3	1	2	1
		1.25 mg/ml	1	0	3	1	2	1
		0.625 mg/ml	1	0	3	1	2	1
	12 h	2.5 mg/ml	1	0	3	1	2	0
		1.25 mg/ml	1	0	3	1	2	0
		0.625 mg/ml	1	0	3	1	2	0
	24 h	2.5 mg/ml	2	1	1	3	2	2
		1.25 mg/ml	2	1	2	3	2	2
		0.625 mg/ml	2	1	3	3	2	2
	48 h	2.5 mg/ml	2	0	3	0	3	0
		1.25 mg/ml	2	0	3	0	3	0
		0.625 mg/ml	2	0	0	3	0	3

Tabelle 6.7: “Score“-Auswertung der TEM von Synovialzellen

Synovialzellen-TEM			Eizelne Partikel sichtbar	Zellkern ausgespart	Partikel im Zytoplasma	Zellform	Partikel sichtbar
nanomag-avidin 130nm:	2 h	2.5 mg/ml					
		1.25 mg/ml	2	3	1	3	3
		0.625 mg/ml					
	48 h	2.5 mg/ml					
		1.25 mg/ml	1	3	2	1	2
		0.625 mg/ml					
nanomag-avidin 250nm:	2 h	2.5 mg/ml					
		1.25 mg/ml	2	3	1	3	3
		0.625 mg/ml					
	48 h	2.5 mg/ml					
		1.25 mg/ml	2	3	3	2	2
		0.625 mg/ml					
liquid research-avidin 10nm:	2 h	2.5 mg/ml					
		1.25 mg/ml	2	3	1	3	1
		0.625 mg/ml					
	48 h	2.5 mg/ml					
		1.25 mg/ml	2	3	1	2	2
		0.625 mg/ml					

Tabelle 6.8: “Score“-Auswertung der TEM von Chondrozyten

Chondrozyten-TEM			Eizelne Partikel sichtbar	Zellkern ausgespart	Partikel im Zytoplasma	Zellform	Partikel sichtbar
nanomag-avidin 130nm:	2 h	2.5 mg/ml					
		1.25 mg/ml	1	3	1	3	3
		0.625 mg/ml					
	48 h	2.5 mg/ml					
		1.25 mg/ml	2	3	3	1	3
		0.625 mg/ml					
nanomag-avidin 250nm:	2 h	2.5 mg/ml					
		1.25 mg/ml	2	3	1	3	3
		0.625 mg/ml					
	48 h	2.5 mg/ml					
		1.25 mg/ml	2	3	3	2	3
		0.625 mg/ml					
liquid research-avidin 10nm:	2 h	2.5 mg/ml					
		1.25 mg/ml	3	3	1	3	1
		0.625 mg/ml					
	48 h	2.5 mg/ml					
		1.25 mg/ml	3	3	2	2	2
		0.625 mg/ml					

Tabelle 6.9: “Score“-Auswertung der TEM von Osteoblasten

Osteoblasten-TEM			Eizelne Partikel sichtbar	Zellkern ausgespart	Partikel im Zytoplasma	Zellform	Partikel sichtbar
nanomag-avidin 130nm:	2 h	2.5 mg/ml					
		1.25 mg/ml	1	3	1	3	2
		0.625 mg/ml					
	48 h	2.5 mg/ml					
		1.25 mg/ml	2	3	2	2	3
		0.625 mg/ml					
nanomag-avidin 250nm:	2 h	2.5 mg/ml					
		1.25 mg/ml	3	3	1	3	3
		0.625 mg/ml					
	48 h	2.5 mg/ml					
		1.25 mg/ml	3	3	3	2	3
		0.625 mg/ml					
liquid research-avidin 10nm:	2 h	2.5 mg/ml					
		1.25 mg/ml	2	3	1	3	2
		0.625 mg/ml					
	48 h	2.5 mg/ml					
		1.25 mg/ml	3	3	1	2	2
		0.625 mg/ml					

Tabelle 6.10: “Score“-Auswertung der „Mapping Local Susceptibility“ von Synovialzellen

Synovialzellen-Local Sus.			Eizelne Partikel sichtbar	Zellkern ausgespart	Partikel im Zytoplasma	Magnetstärke	Partikel sichtbar
nanomag-avidin 130nm:	2 h	2.5 mg/ml	0	0	0	0	0
		1.25 mg/ml					
		0.625 mg/ml					
	48 h	2.5 mg/ml	0	0	0	1	1
		1.25 mg/ml					
		0.625 mg/ml					
nanomag-avidin 250nm:	2 h	2.5 mg/ml	0	0	0	1	1
		1.25 mg/ml					
		0.625 mg/ml					
	48 h	2.5 mg/ml	0	0	0	2	2
		1.25 mg/ml					
		0.625 mg/ml					
liquid research-avidin 10nm:	2 h	2.5 mg/ml	0	0	0	0	0
		1.25 mg/ml					
		0.625 mg/ml					
	48 h	2.5 mg/ml	0	0	0	0	0
		1.25 mg/ml					
		0.625 mg/ml					

Tabelle 6.11: “Score“-Auswertung der „Mapping Local Susceptibility“ von Chondrozyten

Chondrozyten-Local-Sus.			Eizelne Partikel sichtbar	Zellkern ausgespart	Partikel im Zytoplasma	Magnetstärke	Partikel sichtbar
nanomag-avidin 130nm:	2 h	2.5 mg/ml	0	0	0	0	0
		1.25 mg/ml					
		0.625 mg/ml					
	48 h	2.5 mg/ml	0	0	0	0	0
		1.25 mg/ml					
		0.625 mg/ml					
nanomag-avidin 250nm:	2 h	2.5 mg/ml	0	0	0	0	0
		1.25 mg/ml					
		0.625 mg/ml					
	48 h	2.5 mg/ml	0	0	0	1	1
		1.25 mg/ml					
		0.625 mg/ml					
liquid research-avidin 10nm:	2 h	2.5 mg/ml	0	0	0	0	0
		1.25 mg/ml					
		0.625 mg/ml					
	48 h	2.5 mg/ml	0	0	0	0	0
		1.25 mg/ml					
		0.625 mg/ml					

Tabelle 6.12: “Score“-Auswertung der „Mapping Local Susceptibility“ von Osteoblasten

Osteoblasten-Local-Sus.			Eizelne Partikel sichtbar	Zellkern ausgespart	Partikel im Zytoplasma	Magnetstärke	Partikel sichtbar
nanomag-avidin 130nm:	2 h	2.5 mg/ml	0	0	0	0	0
		1.25 mg/ml					
		0.625 mg/ml					
	48 h	2.5 mg/ml	0	0	0	0	0
		1.25 mg/ml					
		0.625 mg/ml					
nanomag-avidin 250nm:	2 h	2.5 mg/ml	0	0	0	0	0
		1.25 mg/ml					
		0.625 mg/ml					
	48 h	2.5 mg/ml	0	0	0	0	0
		1.25 mg/ml					
		0.625 mg/ml					
liquid research-avidin 10nm:	2 h	2.5 mg/ml	0	0	0	0	0
		1.25 mg/ml					
		0.625 mg/ml					
	48 h	2.5 mg/ml	0	0	0	0	0
		1.25 mg/ml					
		0.625 mg/ml					

7 Literaturverzeichnis

1. Ai, H., et al., *Electrostatic layer-by-layer nanoassembly on biological microtemplates: platelets*. Biomacromolecules, 2002. **3**(3): p. 560-4.
2. Anastassakis, J.H., *Colloids Surface A: Physiochemical Eng. Aspects*. Vol. 149. 1999. p. 585.
3. Aufmkolk, B., P.V. Hauschka and E.R. Schwartz, *Characterisations of human bone cells in culture*. J Calcif Tissue Int, 1985. **6**(3): p. 228-35.
4. Babes, L., et al., *Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles Used as MRI Contrast Agents: A Parametric Study*. J Colloid Interface Sci, 1999. **212**(2): p. 474-482.
5. Beckmann, N., et al., *Macrophage labeling by SPIO as an early marker of allograft chronic rejection in a rat model of kidney transplantation*. Magn Reson Med, 2003. **49**(3): p. 459-67.
6. Bellin, M., et al., *Liver metastases: safety and efficacy of detection with superparamagnetic iron oxid in MR imaging*. Radiology, 1994. **193**: p. 657-663.
7. Benderbous, S. and B. Bonnemain, *Superparamagnetic nanoparticles as blood-pool contrast agents. Contribution to MRI preclinical investigations*. Radiologe, 1995. **35**(11 Suppl 2): p. S248-52.
8. Bergmann. and Schaefer, *Lehrbuch der Experimentalphysik*. Elektromagnetismus. 1999, New York: de Gruyter.
9. Bharali, D.J., et al., *Cross-linked polyvinylpyrrolidone nanoparticles: a potential carrier for hydrophilic drugs*. J Colloid Interface Sci, 2003. **258**(2): p. 415-23.
10. Black, J., *Biological Performanca of Materials, Fundamentals of Biocompatibility*. 1999, New York, Basel: Marcel Dekker, Inc.
11. Blesa, M.A. and E. Matijevic, *Phase Transformations of iron oxides, oxohydroxides, and hydrous oxides in aqueous media*. Advances in Colloid and Interface Science, 1989. **29**: p. 173-221.
12. Bonnemain, B., *Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: physicochemical characteristics and clinical applications. A review*. J Drug Target, 1998. **6**(3): p. 167-74.

13. Bordat, C., et al., *Distribution of iron oxide nanoparticles in rat lymph nodes studied using electron energy loss spectroscopy (EELS) and electron spectroscopic imaging (ESI)*. J Magn Reson Imaging, 2000. **12**(3): p. 505-9.
14. Bowen, C.V., et al., *Application of the static dephasing regime theory to superparamagnetic iron-oxide loaded cells*. Magn Reson Med, 2002. **48**(1): p. 52-61.
15. Bozorth, R., *Ferromagnetism*, ed. D.V.N. Co. 1968, Princeton.
16. Cai, L., et al., *Pathways by which interleukin 17 induces articular cartilage breakdown in vitro and in vivo*. Cytokine, 2001. **16**(1): p. 10-21.
17. Chastellain, M., A. Petri, and H. Hofmann, *Particle Size Investigations on a Multi-step Synthesis of PVA Coated Superparamagnetic Nanoparticles*. J. Coll. and Interface Science, 2003.
18. Chemla, Y.R., et al., *Ultrasensitive magnetic biosensor for homogeneous immunoassay*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14268-72.
19. Chikazumi, S., *Physik of Magnetism*, ed. R.E.K.P. Co. 1986, Malabar.
20. Chouly, C., et al., *In vitro study of the hemocompatibility of superparamagnetic contrast agent for magnetic resonance imaging*. Clin Mater, 1994. **15**(4): p. 293-301.
21. Chouly, C., et al., *Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution*. J Microencapsul, 1996. **13**(3): p. 245-55.
22. Daldrup, H.E., et al., *Monitoring radiation-induced changes in bone marrow histopathology with ultra-small superparamagnetic iron oxide (USPIO)-enhanced MRI*. J Magn Reson Imaging, 1999. **9**(5): p. 643-52.
23. De Bari, C., et al., *Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(8): p. 1928-42.
24. Do-Kyung, K., *Superparamagnetic Iron Oxid Nanoparticles for Biomedical Application*. 2001, Royal Institute of Technology: Stockholm.
25. Do-Kyung, K., *Nanoparticles: Engineering, Assembly, and Biomedical Application*. 2002, Royal Institute of Technology: Stockholm.
26. Dodd, C.H., et al., *Normal T-cell response and in vivo magnetic resonance imaging of T cells loaded with HIV transactivator-peptide-derived superparamagnetic nanoparticles*. J Immunol Methods, 2001. **256**(1-2): p. 89-105.
27. Dousset, V., et al., *In vivo macrophage activity imaging in the central nervous system detected by magnetic resonance*. Magn Reson Med, 1999. **41**(2): p. 329-33.

28. Dupas, B., et al., *Electron microscopy study of intrahepatic ultrasmall superparamagnetic iron oxide kinetics in the rat. Relation with magnetic resonance imaging*. Biol Cell, 1999. **91**(3): p. 195-208.
29. Duran, J.D.G., et al., *Surface Chemical Analysis and Electrokinetic Properties of Synthetic Spherical Mixed Zinc-Cadmium Sulfides*. J Colloid Interface Sci, 1997. **193**(2): p. 223-33.
30. Egea, M.A., et al., *Entrapment of cisplatin into biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticles*. Farmaco, 1994. **49**(3): p. 211-7.
31. Evans, C.R., T.A. Spurlin, and B.L. Frey, *In situ FT-IR measurements of competitive vapor adsorption into porous thin films containing silica nanoparticles*. Anal Chem, 2002. **74**(5): p. 1157-64.
32. Ewijk, G., G. Vroege, and A. Philipse, *Convenient preparation methods for magnetic colloids*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials. **201**(1-3): p. 31ff.
33. Fleige, G., et al., *In vitro characterization of two different ultrasmall iron oxide particles for magnetic resonance cell tracking*. Invest Radiol, 2002. **37**(9): p. 482-8.
34. Frederick, M., E. Paulson, and R. Nelson, *Helical CT for detecting focal liver lesions in patients with breast carcinoma: comparison of noncontrast phase, hepatic arterial phase, and portal venous phase*. J Comput Assist Tomogr, 1997. **21**: p. 229-235.
35. Gellissen, J., et al., *Extra- and intracellular accumulation of ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIO) in experimentally induced abscesses of the peripheral soft tissues and their effects on magnetic resonance imaging*. Magn Reson Imaging, 1999. **17**(4): p. 557-67.
36. Ghanem, G.E., et al., *Labelled polycyanoacrylate nanoparticles for human in vivo use*. Appl Radiat Isot, 1993. **44**(9): p. 1219-24.
37. Ginzburg, M., et al., *Genesis of nanostructured, magnetically tunable ceramics from the pyrolysis of cross-linked polyferrocenylsilane networks and formation of shaped macroscopic objects and micron scale patterns by micromolding inside silicon wafers*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(11): p. 2625-39.
38. Gregg, R.V., *Tannic acid-iron alum reactions: stain of choice for macroscopic sections of brain to be embedded in plastic*. Stain Technol, 1975. **50**(2): p. 87-91.
39. Häfeli, U., et al., *Scientific and Clinical Application of Magnetic Carriers*. 1997. p. 628.
40. Hanzlik, M., et al., *Superparamagnetic magnetite in the upper beak tissue of homing pigeons*. Biometals, 2000. **13**(4): p. 325-31.

41. Haukanes, B.I. and C. Kvam, *Application of magnetic beads in bioassays*. Biotechnology (N Y), 1993. **11**(1): p. 60-3.
42. He, Q., et al., *[Study on the targeting of nanoparticles loading TK gene in mice]*. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi, 2003. **20**(2): p. 281-4.
43. Helmberger, T., et al., *[Comparison of dual-phase helical CT with native and ferum oxide-enhanced magnetic resonance imaging in detection and characterization of focal liver lesions]*. Radiologe, 1999. **39**(8): p. 678-84.
44. Hogemann, D., et al., *Improvement of MRI probes to allow efficient detection of gene expression*. Bioconjug Chem, 2000. **11**(6): p. 941-6.
45. Hopwood, D., et al., *Endocytosis of fluorescent microspheres by human oesophageal epithelial cells: comparison between normal and inflamed tissue*. Gut, 1995. **37**(5): p. 598-602.
46. Huang, M., et al., *Uptake of FITC-chitosan nanoparticles by A549 cells*. Pharm Res, 2002. **19**(10): p. 1488-94.
47. Huang, S.H., M.H. Liao, and D.H. Chen, *Direct Binding and Characterization of Lipase onto Magnetic Nanoparticles*. Biotechnol Prog, 2003. **19**(3): p. 1095-1100.
48. Hultman, T., et al., *Direct solid phase sequencing of genomic and plasmid DNA using magnetic beads as solid support*. Nucleic Acids Res, 1989. **17**(13): p. 4937-46.
49. Hussain, N., *Fluorometric method for the simultaneous quantitation of differently-sized nanoparticles in rodent tissue*. Int J Pharm, 2001. **214**(1-2): p. 55-61.
50. Ishida, M., et al., *Iron and copper deposition in chronic active hepatitis and liver cirrhosis; pathogenetic role in progressive liver cell damage*. Eur J Histochem, 1995. **39**(3): p. 221-36.
51. Jamet, M., et al., *Magnetic anisotropy of a single cobalt nanocluster*. Phys Rev Lett, 2001. **86**(20): p. 4676-9.
52. Jijiwa, H., et al., *Passage of dextran magnetite nanoparticles through the subcupular space of the pigeon*. Biol Sci Space, 2001. **15**(4): p. 405-8.
53. Jo, S.K., et al., *Detection of inflammation following renal ischemia by magnetic resonance imaging*. Kidney Int, 2003. **64**(1): p. 43-51.
54. Jones, E.C., et al., *The frequency and significance of small (less than or equal to 15 mm) hepatic lesions detected by CT*. AJR Am J Roentgenol, 1992. **158**(3): p. 535-9.

55. Jordan, A., et al., *Cellular uptake of magnetic fluid particles and their effects on human adenocarcinoma cells exposed to AC magnetic fields in vitro*. Int J Hyperthermia, 1996. **12**(6): p. 705-22.
56. Jung, C.W., *Surface properties of superparamagnetic iron oxide MR contrast agents: ferumoxides, ferumoxtran, ferumoxsil*. Magn Reson Imaging, 1995. **13**(5): p. 675-91.
57. Jung, C.W. and P. Jacobs, *Physical and chemical properties of superparamagnetic iron oxide MR contrast agents: ferumoxides, ferumoxtran, ferumoxsil*. Magn Reson Imaging, 1995. **13**(5): p. 661-74.
58. Junghans, M., J. Kreuter, and A. Zimmer, *Antisense delivery using protamine-oligonucleotide particles*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(10): p. E45.
59. Kahn, E., et al., *Distribution of injected MRI contrast agents in mouse livers studied by confocal and SIMS microscopy*. Anal Quant Cytol Histol, 2002. **24**(5): p. 295-302.
60. Kamm, W., et al., *Evaluation of absorption enhancement for a potent cyclopeptidic $\alpha(\text{nu})\beta(3)$ -antagonist in a human intestinal cell line (Caco-2)*. Eur J Pharm Sci, 2000. **10**(3): p. 205-14.
61. Kang, Y., et al., *Synthesis and Characterization of nanometer-size Fe_3O_4 and Fe_2O_3 particles*. Chem. Mater. 8, 1996. **2209**.
62. Khalafalla, S. and G. Reimers, *Preparation of Dilution-Stable Aqueous Magnetic Fluids*. IEEE Transaction on Magnetics, 1980. **16**: p. 178-183.
63. Kim, I.S. and S.H. Kim, *Development of a polymeric nanoparticulate drug delivery system. In vitro characterization of nanoparticles based on sugar-containing conjugates*. Int J Pharm, 2002. **245**(1-2): p. 67-73.
64. Kim, I.S. and S.H. Kim, *Development of polymeric nanoparticulate drug delivery systems: evaluation of nanoparticles based on biotinylated poly(ethylene glycol) with sugar moiety*. Int J Pharm, 2003. **257**(1-2): p. 195-203.
65. Kissel, T. and M. Roser, *Influence of chemical surface-modifications on the phagocytic properties of albumin nanoparticles*. Proceed. Intern.symp.Control. Rel. Bioact. Mater., 1991. **18**: p. 275-276.
66. Klyachko, N., et al., *Catalysis by enzymes entrapped into hydrated surfactant aggregates having lamellar or cylindrical (hexagonal) or ball-shaped (cubic) structure in organic solvents*. Eur. J. Biochem., 1986. **161**(149-154).
67. Konishi, Y., et al., *Chronic effect of aluminium ingestion on bone in calcium-deficient rats*. Pharmacol Toxicol, 1996. **78**(6): p. 429-34.

68. Krause, M., et al., *MRI of blood volume and cellular uptake of superparamagnetic iron in an animal model of choroidal melanoma*. Ophthalmic Res, 2002. **34**(4): p. 241-50.
69. Kresse, M., et al., *Targeting of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) particles to tumor cells in vivo by using transferrin receptor pathways*. Magn Reson Med, 1998. **40**(2): p. 236-42.
70. Kuchiwaki, H., et al., *Iron in cicatrix and abnormal CT findings in a patient with posttraumatic epilepsy*. Neurochirurgia (Stuttg), 1989. **32**(4): p. 116-9.
71. Laverman, P., et al., *Recognition and clearance of methoxypoly(ethyleneglycol)2000-grafted liposomes by macrophages with enhanced phagocytic capacity. Implications in experimental and clinical oncology*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1526**(3): p. 227-9.
72. Lee, J.H., et al., *Polymeric nanoparticle composed of fatty acids and poly(ethylene glycol) as a drug carrier*. Int J Pharm, 2003. **251**(1-2): p. 23-32.
73. Lerner, R. and L. George, *Encyclopedia of physics*, ed. I. VCH-Publishers. 1991, Basel.
74. Lories, R.J., et al., *In vitro growth rate of fibroblast-like synovial cells is reduced by methotrexate treatment*. Ann Rheum Dis, 2003. **62**(6): p. 568-71.
75. Lu, J.P., et al., *Transferrin receptors and selective iron deposition in pancreatic B cells of iron-overloaded rats*. Acta Pathol Jpn, 1991. **41**(9): p. 647-52.
76. Lucet, I., et al., *[Transmission electron microscopy in the structural study of superparamagnetic contrast agents for MRI]*. Bull Assoc Anat (Nancy), 1994. **78**(240): p. 57-9.
77. Maaßen, S., E. Fattal, and R. Müller, *Cell cultures of the assesement of toxicity and uptake of polymeric particulate carriers*. Pharma Sciences, 1993. **3**: p. 11-22.
78. Mandal, M., et al., *Wet chemical method for synthesis of superparamagnetic alloyed Ni--Pd and Ni--Pt nanomagnets in micelles*. J Colloid Interface Sci, 2003. **265**(1): p. 23-8.
79. Maniwa, S., et al., *Effects of hyaluronic acid and basic fibroblast growth factor on motility of chondrocytes and synovial cells in culture*. Acta Orthop Scand, 2001. **72**(3): p. 299-303.
80. Markowitz, M.A., et al., *The Effect of Membrane Charge on Gold Nanoparticle Synthesis via Surfactant Membranes*. J Colloid Interface Sci, 1999. **210**(1): p. 73-85.
81. Massart, R., *Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acid Media*. IEEE Transaction on Magnetism, 1981. **17**(2): p. 1247-1248.

82. Massart, R., et al., *Preparation and Properties of monodisperse magnetic fluids*. J. of Magnetism and Magnetic Materials, 1995. **149**: p. 1-5.
83. Masui, T., et al., *Assessment of early radiation effects on the liver. Comparison of SPECT and MR*. Acta Radiol, 1996. **37**(5): p. 665-71.
84. Meguro, R., et al., *Perfusion-Perls and -Turnbull methods supplemented by DAB intensification for nonheme iron histochemistry: demonstration of the superior sensitivity of the methods in the liver, spleen, and stomach of the rat*. Histochem Cell Biol, 2003. **120**(1): p. 73-82.
85. Merodio, M., et al., *Distribution of albumin nanoparticles in animals induced with the experimental allergic encephalomyelitis*. J Drug Target, 2000. **8**(5): p. 289-303.
86. Mohamed-Ali, H., et al., *Synovial and peritoneal macrophages in organoid culture*. Histol Histopathol, 1995. **10**(2): p. 393-403.
87. Moore, A., et al., *MRI of insulinitis in autoimmune diabetes*. Magn Reson Med, 2002. **47**(4): p. 751-8.
88. Mori, T., et al., *Intracisternal increase of superoxide anion production in a canine subarachnoid hemorrhage model*. Stroke, 2001. **32**(3): p. 636-42.
89. Morris, C.M., et al., *Histochemical distribution of non-haem iron in the human brain*. Acta Anat (Basel), 1992. **144**(3): p. 235-57.
90. Müller, R., et al., *Intravenous injected particles, surface properties and interaction with blood proteins - The key determining the organ distribution*; Häfeli U, Schütt W : Scientific and Clinical Application of Magnetic Carriers, 1997: p. 135-148.
91. Nakamura, K., et al., *Regional intestinal absorption of FITC-dextran 4,400 with nanoparticles based on beta-sitosterol beta-d-glucoside in rats*. J Pharm Sci, 2003. **92**(2): p. 311-8.
92. Neuberger, T., *Wirkung von superparamagnetischen Nanopartikeln auf Zellen des Bewegungsapparates; In vitro Studie an Osteoblasten, Chondrozyten und Synovialzellen*. 2002, Universität Zürich: Zürich. p. 1-74.
93. Oertel, J., *[Iron in bone marrow]*. Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch, 1982. **109**(5): p. 697-715.
94. Okon, E., et al., *Biodegradation of magnetite dextran nanoparticles in the rat. A histologic and biophysical study*. Lab Invest, 1994. **71**(6): p. 895-903.
95. Olsvik, O., et al., *Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology*. Clin Microbiol Rev, 1994. **7**(1): p. 43-54.

96. Oswald, P., et al., *Liver positive enhancement after injection of superparamagnetic nanoparticles: respective role of circulating and uptaken particles*. Magn Reson Imaging, 1997. **15**(9): p. 1025-31.
97. Parag-Nikolic, M., et al., *[Use of Berlin-blue reaction in the determination of siderophages in cerebrospinal fluid]*. Acta Med Iugosl, 1974. **28**(1): p. 3-14.
98. Pardoe, H., et al., *Structural and magnetic properties of nanoscale iron oxide particles synthesized in the presence of dextran or polyvinyl alcohol*. J. of Magnetism and Magnetic Materials, 2001. **225**: p. 41-46.
99. Parfrey, P.S., et al., *Iron overload despite partial gastrectomy*. Postgrad Med J, 1979. **55**(648): p. 747-50.
100. Parfrey, P.S., et al., *Iron overload in beta-thalassaemia minor. A family study*. Scand J Haematol, 1981. **27**(4): p. 294-302.
101. Park, J.I. and J. Cheon, *Synthesis of "solid solution" and "core-shell" type cobalt-platinum magnetic nanoparticles via transmetalation reactions*. J Am Chem Soc, 2001. **123**(24): p. 5743-6.
102. Paul, J., *Zell- und Gewebelehre*. Vol. Vol. 1. 1980, Berlin, New York: Walter de Gruyter. 464.
103. Pinkerton, K.E., et al., *Aerosolized fluorescent microspheres detected in the lung using confocal scanning laser microscopy*. Microsc Res Tech, 1993. **26**(5): p. 437-43.
104. Pinto-Alphandary, H., O. Balland, and P. Couvreur, *A new method to isolate polyalkylcyanoacrylate nanoparticle preparations*. J Drug Target, 1995. **3**(2): p. 167-9.
105. Porta, C., et al., *Confocal analysis of fluorescent bead uptake by mouse Peyer's patch follicle-associated M cells*. Exp Physiol, 1992. **77**(6): p. 929-32.
106. Pouliquen, D., et al., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a liver MRI contrast agent: contribution of microencapsulation to improved biodistribution*. Magn Reson Imaging, 1989. **7**(6): p. 619-27.
107. Pouliquen, D., et al., *Iron oxide nanoparticles for use as an MRI contrast agent: pharmacokinetics and metabolism*. Magn Reson Imaging, 1991. **9**(3): p. 275-83.
108. Rausch, M., et al., *Dynamic patterns of USPIO enhancement can be observed in macrophages after ischemic brain damage*. Magn Reson Med, 2001. **46**(5): p. 1018-22.
109. Rausch, M., et al., *In-vivo visualization of phagocytotic cells in rat brains after transient ischemia by USPIO*. NMR Biomed, 2002. **15**(4): p. 278-83.

110. Reese, T., et al., *Regional brain activation by bicuculline visualized by functional magnetic resonance imaging. Time-resolved assessment of bicuculline-induced changes in local cerebral blood volume using an intravascular contrast agent*. NMR Biomed, 2000. **13**(1): p. 43-9.
111. Reimer, P., et al., *Dynamic signal intensity changes in liver with superparamagnetic MR contrast agents*. J Magn Reson Imaging, 1992. **2**(2): p. 177-81.
112. Resmi, M.R., et al., *Charge-Transfer Complexation of C(60) with Diphenyltetraathiafulvalene (DPTTF) Capped Gold Clusters*. J Colloid Interface Sci, 1999. **217**(2): p. 395-402.
113. Reuter, P., *Springer Grosswörterbuch Medizin*, ed. Springer-Verlag. 2001, Berlin.
114. Riede, U.-N. and G. Köhler, *Taschenatls der allgemeinen Patologie*. 1998: Georg ThiemeVerlag.
115. Ros, P.R., et al., *Hepatic MR imaging with ferumoxides: a multicenter clinical trial of the safety and efficacy in the detection of focal hepatic lesions*. Radiology, 1995. **196**(2): p. 481-8.
116. Rousseau, V., et al., *NMR investigation of experimental chemical induced brain tumors in rats, potential of a superparamagnetic contrast agent (MD3) to improve diagnosis*. Magma, 1998. **6**(1): p. 13-21.
117. Ruehm, S.G., et al., *Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaque with ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in hyperlipidemic rabbits*. Circulation, 2001. **103**(3): p. 415-22.
118. Russell-Jones, G.J., H. Veitch, and L. Arthur, *Lectin-mediated transport of nanoparticles across Caco-2 and OK cells*. Int J Pharm, 1999. **190**(2): p. 165-74.
119. Sahoo, S.K., et al., *pH- and Thermo-sensitive Hydrogel Nanoparticles*. J Colloid Interface Sci, 1998. **206**(2): p. 361-368.
120. Schmidt, R.F. and T. Gerhard, *Physiologie des Menschen*. Vol. 26. 1995: Springer. 888.
121. Schmitz, S.A., et al., *Iron-oxide-enhanced magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaques: postmortem analysis of accuracy, inter-observer agreement, and pitfalls*. Invest Radiol, 2002. **37**(7): p. 405-11.
122. Schneider, J.J., et al., *Metallorganic routes to nanoscale iron and titanium oxide particles encapsulated in mesoporous alumina: formation, physical properties, and chemical reactivity*. Chemistry, 2000. **6**(23): p. 4305-21.

123. Siauve, N., et al., *The rete mirabile of the eel: a useful model for the study of transcapillary passage of MR contrast agents*. J Magn Reson Imaging, 1999. **9**(2): p. 353-61.
124. Ström, V. and K. Rao, *Mapping local susceptibility using a scanning coaxial write/read head*. J. Vac. Sci. Technol., 1998. **16**(4): p. 2687-2692.
125. Ström, V. and K. Rao, *A novel method for magnetic imaging: determination of local in-plane susceptibility at a surface*. J. Magn. Magn. Mat., 2000. **215-216**: p. 723-725.
126. Suh, H., et al., *Cellular uptake study of biodegradable nanoparticles in vascular smooth muscle cells*. Pharm Res, 1998. **15**(9): p. 1495-8.
127. Tanoura, T., et al., *MR lymphography with iron oxide compound AMI-227: studies in ferrets with filariasis*. AJR Am J Roentgenol, 1992. **159**(4): p. 875-81.
128. Terrier, F., et al., *Magnetic resonance imaging with superparamagnetic iron oxide particles to evaluate hepatic macrophage-monocytic phagocytosis after arterial devascularization in minipigs*. Acad Radiol, 1995. **2**(7): p. 565-75.
129. Torjussen, W., et al., *Topochemistry of trace metals in nasal mucosa. Potentialities of some histochemical methods and energy dispersive X-ray microanalysis*. Acta Histochem, 1978. **63**(1): p. 11-25.
130. Turnbull, A.J., et al., *The prevalence of hereditary haemochromatosis in a diabetic population*. Qjm, 1997. **90**(4): p. 271-5.
131. Van Beers, B.E., et al., *Biodistribution of ultrasmall iron oxide particles in the rat liver*. J Magn Reson Imaging, 2001. **13**(4): p. 594-9.
132. Videira, M.A., et al., *Lymphatic uptake of pulmonary delivered radiolabelled solid lipid nanoparticles*. J Drug Target, 2002. **10**(8): p. 607-13.
133. Wadghiri, Y.Z., et al., *Detection of Alzheimer's amyloid in transgenic mice using magnetic resonance microimaging*. Magn Reson Med, 2003. **50**(2): p. 293-302.
134. Wang, H., et al., *Iron deposition in renal biopsy specimens from patients with kidney diseases*. Am J Kidney Dis, 2001. **38**(5): p. 1038-44.
135. Weissleder, R., et al., *Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: an intravenous contrast agent for assessing lymph nodes with MR imaging*. Radiology, 1990. **175**(2): p. 494-8.
136. Weissleder, R., et al., *MR receptor imaging: ultrasmall iron oxide particles targeted to asialoglycoprotein receptors*. AJR Am J Roentgenol, 1990. **155**(6): p. 1161-7.

137. Weissleder, R., et al., *In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression*. Nat Med, 2000. **6**(3): p. 351-5.
138. Wen, G., et al., *Superparamagnetic iron oxide (Feridex)-enhanced MRI in diagnosis of focal hepatic lesions*. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002. **22**(5): p. 451-2.
139. Woods, S.I., et al., *Direct investigation of superparamagnetism in Co nanoparticle films*. Phys Rev Lett, 2001. **87**(13): p. 137205.
140. Wu, X., et al., *Structural Characterizations of Organo-Capped Barium Titanate Nanoparticles Prepared by the Wet Chemical Route*. J Colloid Interface Sci, 2001. **239**(2): p. 369-373.
141. Yeh, T.C., et al., *Intracellular labeling of T-cells with superparamagnetic contrast agents*. Magn Reson Med, 1993. **30**(5): p. 617-25.
142. Zhang, Y., et al., *Magnetic resonance imaging detection of rat renal transplant rejection by monitoring macrophage infiltration*. Kidney Int, 2000. **58**(3): p. 1300-10.
143. Zhao, M., et al., *Non-invasive detection of apoptosis using magnetic resonance imaging and a targeted contrast agent*. Nat Med, 2001. **7**(11): p. 1241-4.
144. Zhao, M., et al., *Differential conjugation of tat Peptide to superparamagnetic nanoparticles and its effect on cellular uptake*. Bioconjug Chem, 2002. **13**(4): p. 840-4.

8 Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinen Eltern Gabriele und Helmut Schöpf bedanken für die Unterstützung und den Rückhalt in meinem bisherigen Leben. Ich wusste, dass sie jederzeit für mich da sind. Ausserdem danke ich ihnen dafür, dass sie mir ermöglicht haben meinen Wunsch zu erfüllen, einmal Tierarzt zu sein.

Besonderer Dank gilt PD Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg für die Überlassung des interessanten Themas, die hervorragende und geduldige Betreuung während der ganzen Zeit bei der MSRU, die schnelle Durchsicht der Arbeit, die Übernahme des Referates, sowie für das Engagement und Interesse auch im privaten Bereich.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. med. vet. Jörg Auer für die Überlassung des Themas, sowie die angenehme Atmosphäre im Departement.

Prof. Dr. med.vet. Andreas Pospischil möchte ich dafür danken, dass es möglich war histologische Methoden in seinem Institut durchführen zu können und dass er das Korreferat für diese Arbeit übernommen hat.

Einen herzlichen Dank auch an Katie Zlinsky, Adrian Fairburn, Ursula Theiler und Lisbeth Nufer für die exzellente Unterstützung bei der Durchführung meiner *in vitro* Versuche und der Anfertigung der histologischen Nachweisemethoden.

Vielen Dank auch an die Partner des „Magnanomed“-Projektes, v.a. M. Hoffmann, H. Hoffmann, A. Petri, KV. Rao, V. Ström, F. Westphal und J. Teller für die gute Zusammenarbeit.

Ein ganz grosses Dankeschön gilt auch meinen MitdoktorandInnen bei der MSRU, Anja Hering, Jan Kümmerle, Matthias Kemper, Andrea Oberle, Tobias Neuberger, Dorina Hambsch, Jens Langhoff, Regula Keel und Katja Schulze, mit denen ich viel in der MSRU und auch privat erlebt habe und die sehr viel zu der wunderbaren Zeit in Zürich beigetragen haben.

„A liabs Grüessli“ auch an meine WGs während des Studiums (Claudi, Anja, Dani, Mic) und während der Doktorarbeit (Gabriela, Juliette, Helena), die mir die notwendige Abwechslung in dieser Zeit ausserhalb der Tiermedizin geben konnten. Besonderen Dank auch noch an Dani für die Durchsicht der Arbeit in Bezug auf sprachliche Korrektheit.

Danke, Familie Mooseler, nicht nur für die Arbeit bei Euch, sondern auch für die Freundschaft während der Zeit in Zürich.

Ganz lieber Dank auch an meine Schwestern Sylvia Schöpf und Birgit Lambertz, mit denen ich schon viel erlebt habe und von denen ich wusste, dass sie jederzeit zu Rat und Tat an meiner Seite standen.

Und „last but not least“: Der liebste Dank gilt Laura Loch, die für mich auch in schwierigen Zeiten immer da war und selbstverständlich da ist und massgeblich an der sehr schönen Zeit in Zürich beigetragen hat.

Lebenslauf

Name: Bernhardt Schöpf

Geburtstag: 6. November 1972

Geburtsort: Landshut / Deutschland

Vater: Dipl. Ing. Agr. Helmut August Schöpf (Diplomagraringenieur)

Mutter: Gabriele Maria Ursula Schöpf; geb. Götz (Apothekerin)

Geschwister: Birgit Lambertz; geb. Schöpf (Architektin)
Sylvia Schöpf (Apothekerin)

Schulbildung: **1979 – 1983:** Grundschule St. Lantpert in Freising, Deutschland
1983 – 1992: Josef-Hofmiller-Gymnasium in Freising, Deutschland
Abschluss im Juli 1992: Allgemeine Hochschulreife

Wehrersatzdienst: **1992 – 1993:** 15 Monate Zivildienst bei der Werkstätte für Behinderte der Lebenshilfe Freising, Deutschland

Ausbildung: **1993 – 1995:** Ausbildung zum Tischler / Schreiner bei der Schreinerei August Geiger in Wolfach, Deutschland
Abschluss im September 1995: Gesellenbrief an der Gewerblichen Berufsschule in Wolfach

Studium: **1995 – 2001:** Studium der Veterinärmedizin
an der Justus-Liebig-Universität in Giessen, Deutschland
Abschluss im August 2001: Tierarzt
Approbation im September 2001

Dissertation: **2002 – 2003:** In der Abteilung Musculoskeletal Research Unit (MSRU) der Pferdeklinik der Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich